

JÚLIO CESAR DE CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
A PARTIR DE *MONASCUS* POR FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2004

JÚLIO CESAR DE CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
A PARTIR DE *MONASCUS* POR FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Departamento de Engenharia Química – Setor de Tecnologia, UFPR

Examinadores:

Prof. Dr. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros – Departamento de Engenharia Química – UFPR
Prof. Dr. Agenor Furigo Jr. – Departamento de Engenharia Química e Alimentos – UFSC
Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – Departamento de Química – FURG
Prof. Dr. Jose Angel Rodriguez-León – ICIDCA – Cuba / Prof. Visitante – UFPR

CURITIBA

2004

Termo de Aprovação

AGRADECIMENTOS

Posso me congratular por ter recebido o apoio de muitas pessoas, amigos, colegas e mestres, que me ajudaram e que são em parte responsáveis pelo bom termo a que chegou este trabalho. Depois de pouco mais de uma década, o LPB conta com uma equipe coesa, onde a regra tem sido a solidariedade no trabalho. A todos agradeço, e mesmo correndo o risco da omissão de nomes, agradeço especialmente:

Ao Prof. Soccol, meu orientador neste trabalho, e com cuja orientação para a carreira acadêmica pude contar desde o final da graduação;

À profa. Adriane, pela revisão inicial, dando contribuições importantes, e pela participação nas bancas de avaliação, e aos profs. José Angel, que ajudou de forma entusiasmada na discussão da análise respirométrica e nas bancas de avaliação, e Jean, pelas idéias para análise cromatográfica;

Ao professor Agenor, amigo e ex-orientador, e ao prof Jorge; ambos se prontificaram em prazo exíguo a contribuir na avaliação deste trabalho;

Às professoras Adenise e Luciana, pelo apoio e confiança no dia a dia da UFPR;

Aos colegas Débora, pela ajuda com o equipamento de respirometria, e Radjis, pela ajuda com análises cromatográficas, partes críticas do trabalho de laboratório;

Aos funcionários Cláudio, Rosane e Cleusa, da PUC-PR, sempre solícitos e competentes, e à Mitiyo, da UFPR, pela inestimável ajuda, pronta e eficiente, em todas as etapas práticas do trabalho;

Aos estagiários Carolina e Susan, que trabalharam com disposição nas etapas iniciais deste projeto, e sobretudo ao Bruno, cuja ajuda, disposição e bom humor foram vitais para as etapas finais;

E por último, porque em destaque, agradeço à minha família – meus pais Sônia e César, e meus irmãos Marco, Dayse e Lucrécia – pelo apoio em todas as fases de minha formação, e agradeço à minha namorada Lílían – que muito mais do que revisar o texto, é toda a paciência, amor e disposição de que eu precisava para escrever este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E símbolos	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura.....	3
2.1 Pigmentos – visão geral	3
2.1.1 Terminologia.....	3
2.1.2 Histórico.....	3
2.1.3 Por que usar corantes em alimentos?	4
2.1.4 Cor e estrutura.....	5
2.1.5 Pigmentos naturais versus artificiais	7
2.1.6 Pigmentos microbianos	10
2.1.7 Mercado de pigmentos	10
2.2 Pigmentos de Monascus	12
2.3 O microorganismo	15
2.3.1 Ocorrência	15
2.3.2 Linhagens usadas para a produção de pigmentos	15
2.3.3 Morfologia.....	16
2.3.4 Cepas utilizadas	17
2.4 Crescimento e produção de metabólitos	18
2.4.1 Condições físicas de cultivo:	19
2.4.2 Fermentação em meio sólido/submerso	20
2.4.3 Teor de umidade em meios sólidos	21
2.4.4 Composição do meio de cultivo	21
2.4.5 Outros fatores nutricionais	23
2.5 Métodos de fermentação	24
2.6 Toxicidade dos pigmentos e produção de citrinina.....	25
2.6.1 Citrinina – propriedades e análise.....	26
2.7 Métodos de análise de pigmentos	28
2.8 Uso e estabilidade de pigmentos de Monascus	30

2.9 Método de análise de biomassa	30
3 Material e Métodos	33
3.1 Cepas e Manutenção.....	33
3.2 Preparação de inóculos.....	33
3.2.1 Inóculos em meio líquido.....	33
3.2.2 Suspensões de esporos.....	34
3.3 Comparação de cepas	34
3.3.1 Determinação de crescimento radial.....	34
3.3.2 Comparação de cepas quanto à produção de pigmentos	35
3.4 Comparação de métodos de extração.....	35
3.4.1 Extrações estática, agitada, com Soxhlet, com diferentes solventes	35
3.5 Substratos utilizados	35
3.5.1 FSS em arroz, em coluna, frasco ou bandeja.....	35
3.5.2 FSS em bagaço de mandioca, em coluna, frasco ou bandeja	36
3.5.3 FSS de diferentes substratos potenciais, em frascos	36
3.6 Otimização das condições de cultivo em bagaço de mandioca	36
3.7 Ensaios de estabilidade de pigmentos	37
3.7.1 Isolamento da biomassa	37
3.7.2 Preparação de extratos	37
3.7.3 Soluções de pigmentos	37
3.7.4 Análises de estabilidade.....	38
3.8 Extração de pigmentos e análise da absorbância.....	38
3.8.1 Extração de pigmentos na comparação de substratos	40
3.9 Extração e análise da citrinina	40
3.9.1 Extração	40
3.9.2 Cromatografia preparativa de citrinina	40
3.9.3 Análise de citrinina	41
3.10 Análise de biomassa em FSS.....	41
3.10.1 Preparo de padrão de biomassa	41
3.10.2 Extração da biomassa.....	41
3.10.3 Extração do ergosterol	41
3.10.4 Análise do ergosterol.....	42
3.11 Análise respirométrica.....	42

3.11.1	Respirometria em colunas.....	42
3.11.2	Respirometria em reator.....	43
3.12	Cálculos - Regressão, ajuste de curvas e parâmetros cinéticos	43
4	<i>Resultados e discussão.....</i>	43
4.1	Isolamento e caracterização do microorganismo.	44
4.2	Comparação de cepas.	45
4.3	Otimização das condições de extração de pigmentos	48
4.3.1	Extrações estáticas ou agitadas.....	48
4.3.2	Extração usando diferentes solventes	48
4.3.3	Quantidade de solvente	51
4.3.4	Eficiência na extração	52
4.4	Comparação de diferentes substratos	53
4.5	Ensaio utilizando bagaço de mandioca como substrato.....	55
4.5.1	Teor de umidade na FSS de bagaço de mandioca	55
4.5.2	Cinética de produção de pigmentos em bagaço de mandioca	56
4.5.3	Otimização das condições de cultivo em bagaço de mandioca.	57
4.6	Desenvolvimento do método de análise de biomassa via ergosterol.	62
4.7	Determinação da aeração adequada, em coluna de Raimbault.....	63
4.8	Análise respirométrica em colunas	64
4.8.1	Fases da fermentação:.....	67
4.8.2	Determinação dos parâmetros da fermentação usando o programa FERSOL.....	68
4.9	Correlação biomassa-pigmento.....	69
4.10	Cinética de fermentação em reator do tipo tambor horizontal	70
4.11	Comparação da produção em frascos, colunas, bandeja e reator tipo tambor horizontal, com arroz como substrato	74
4.12	Avaliação da estabilidade dos pigmentos	75
5	<i>Conclusões e sugestões</i>	79
5.1.1	LPB 31 é uma linhagem adequada para a produção industrial de pigmentos.	79
5.1.2	Etanol é o solvente orgânico mais adequado para a extração de pigmentos.	79
5.1.3	Arroz é o substrato bruto mais adequado para a produção de pigmentos.	79
5.1.4	Bagaço de mandioca puro é um substrato potencial para produção de extratos.....	80

5.1.5 Condições para cultivo em meio sólido – arroz.	80
5.1.6 Estabilidade de pigmentos de <i>Monascus</i>	80
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	81
5.2.1 Geração e seleção de linhagens mutantes de <i>Monascus</i>	81
5.2.2 Formulações com substratos mistos.....	81
5.2.3 Desenvolvimento de um condicionador de ar para reatores de FSS	81
6 Referências Bibliográficas	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC: American Type Culture Collection, banco de cepas - EUA

BM: bagaço de mandioca

ca: *circa* (cerca de)

CCT: Centro de Culturas Tropicais, banco de cepas da Fundação André Tosello – Brasil

DMSO: dimetil sulfóxido

FL: fermentação líquida

FSS: fermentação em substrato sólido

LPB: laboratório de processos biotecnológicos

NmL, NL: normal mililitro ou normal litro, volume de gás expresso em condições padrão (0 °C, 1 atm)

NRRL: Northern Research Regional Laboratories, banco de cepas público - EUA

PA – para análise

PDA – potato dextrose Agar

PTS: proteína texturizada de soja

μ : velocidade específica de crescimento microbiano (em tempo⁻¹)

μ_{\max} : velocidade máxima específica de crescimento microbiano

UA: unidades de absorbância

UV: ultravioleta

v/v volume por volume

v/m volume por massa

YEA: levedura seca de panificação

RESUMO

Os pigmentos naturais de *Monascus* apresentam um grande potencial para a agroindústria, podendo agregar valor a matérias-primas baratas como cereais e outros substratos amiláceos. No presente trabalho, determinou-se meio e condições de cultivo, extração, análise de pigmento e de citrinina e parâmetros cinéticos para a linhagem LPB 31, um isolado do gênero *Monascus*, e estimou-se a estabilidade dos pigmentos para aplicação em alimentos. Os resultados obtidos indicam que a linhagem isolada é adequada à produção de pigmentos por FSS.

O solvente mais adequado para extração é etanol a 60%, com a agitação por 1h do fermentado com o solvente, à temperatura ambiente, na proporção de 3 partes de solvente para 1 parte de fermentado seco. Extrações à exaustão podem aumentar o rendimento da extração em 20%.

A forma de fermentação influencia bastante a produção, devido à perda de umidade e outros fatores físicos. Comparado a outros substratos, o arroz é o substrato bruto mais adequado à fermentação, embora o bagaço de mandioca apresente potencial de aplicação para a produção de extratos de pigmento. Para a produção de pigmentos de *Monascus* em FSS, as condições mais adequadas são as de aeração forçada (com ar saturado de umidade) de 1NmL/min.g de substrato úmido, para um leito de 8 cm de altura, durante 8 dias, com inóculo vegetativo, a 32°C. Obtém-se nessas condições uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,039h^{-1}$, e uma velocidade específica de produção de pigmentos de $27,5 \text{ UA/g biomassa.h}^{-1}$ e uma produção da ordem de 110UA/g produto seco. A produção também pode ser feita em bandejas, com produção de pigmento inferior, mas ainda comercialmente adequada. Nesse caso recomenda-se uma altura de leito de 2 cm. A produção de citrinina pela linhagem LPB 31 é inferior às outras linhagens testadas. Os pigmentos de *Monascus* são instáveis frente a extremos de pH e temperaturas altas, devendo ser usados em aplicações a temperaturas inferiores a 60°C e pH próximos da neutralidade.

PALAVRAS-CHAVE

Pigmentos naturais, *Monascus*, fermentação em substrato sólido, arroz, bagaço de mandioca

ABSTRACT

Natural pigments from *Monascus* present a high potential for agro-industries, since they may add value to cheap raw materials such as cereals and other starchy substrates. In the present work, the adequate conditions for cultivation, extraction, pigment production and citrinin analysis were defined for the strain LPB 31, an isolate from the genus *Monascus*. It were also determined the kinetic parameters and pigment stability for food applications. The results indicate that this strain is adequate for the production of pigments in SSF (solid substrate fermentation).

The best solvent for extraction is 60% ethanol, with shaking for 1h of the fermentate with the solvent, at ambient temperature, in the proportion of 3 parts solvent to 1 part dry fermentate. Exhaustive extractions may improve extraction yield up to 20%.

The fermentation method highly affects production, an effect due to humidity loss and other physical factors. Compared to other substrates, rice is the raw material most adequate to fermentation, although cassava bagasse shows potential use for the production of pigment extracts.

Regarding the production of *Monascus* pigments in SSF, the ideal conditions are forced aeration (with moist air) of 1NmL/min.g dry substrate, for an 8 cm high bed, for 8 days, with a vegetative inoculum, at 32°C. In such conditions, a maximum specific velocity of 0.039h^{-1} is obtained, and the maximum specific pigment production velocity is $27.5\text{ UA/g biomass.h}^{-1}$, with a production of the order of 110 UA/g dry product. Production may also be accomplished in trays, with a lower pigment production, but still commercially feasible. In this case, it is recommended a bed height of 2 cm. Citrinin production by the strain LPB 31 is lower than other tested strains. *Monascus* pigments are unstable to extreme pH and high temperature, so that they should be used in food applications at temperatures lower than 60°C and pH near neutrality.

KEYWORDS

Natural pigments, *Monascus*, solid substrate fermentation, rice, cassava bagasse

1 INTRODUÇÃO

A cor é uma característica essencial dos alimentos. Embora a cor de um alimento nem sempre tenha relação direta com o valor nutricional, tem importância central na sua *aceitabilidade*. Os pigmentos naturais vêm tendo uma participação cada vez mais importante no mercado, devido às restrições cada vez maiores no uso de corantes sintéticos. Esses pigmentos naturais são de origens diversas, como plantas ou animais.

Pigmentos microbianos, por sua vez, apresentam-se como uma alternativa viável aos outros pigmentos de origem animal ou vegetal, porque são considerados naturais, não apresentam problemas de sazonalidade e possuem produtividade alta.

Entre os pigmentos passíveis de produção por fermentação, destacam-se os pigmentos de *Monascus sp*, um fungo filamentoso que produz uma série de pigmentos de estrutura policetílica, com cores que variam entre tons de amarelo, laranja e vermelho. Como ocorre com diversos outros fungos, as linhagens de *Monascus* produzem também micotoxinas, contaminantes cuja quantidade deve ser a mínima possível em um produto. No caso de *Monascus*, a micotoxina produzida é a citrinina, uma substância nefrotóxica que apresenta também atividade antibiótica.

Os pigmentos de *Monascus* vêm sendo usados em alimentos tradicionais, em países orientais, há séculos. No entanto, a pesquisa sobre a produção e aplicação industrial desses pigmentos é bem mais recente e ganhou força especialmente na última década, em conjunção com a produção de outros aditivos alimentares por fermentação. A produção tradicional desses pigmentos é feita por fermentação em arroz cozido, distribuído em bandejas, ao passo que a pesquisa e a produção industrial geralmente são voltadas para a fermentação submersa.

Os pigmentos de *Monascus* apresentam uso potencial em produtos cárnicos, bebidas, molhos e sopas, embora seu uso não seja ainda regulamentado em diversos países ocidentais. Tanto a produção em substrato sólido, mais eficiente em termos de quantidade e concentração de pigmentos, quanto a aplicabilidade desses pigmentos na indústria de alimentos traduzem-se em um grande potencial de agregação de valor a matérias-primas abundantes no estado do Paraná, motivo pelo qual adotou-se essa linha de pesquisa.

Este trabalho apresenta, numa abordagem de desenvolvimento de processo, uma descrição das informações em que se fundamentou, e os resultados que se obteve, em um plano de trabalho de doutorado, cujo objetivo era o de *produzir pigmentos de Monascus por fermentação em substrato sólido*.

A *revisão da literatura* apresenta algumas informações importantes e de domínio público sobre pigmentos naturais, a produção de pigmentos por *Monascus*, a análise de biomassa e de citrinina e os métodos de cultivo.

A *seção material e métodos* descreve as técnicas tradicionais ou eventualmente desenvolvidas e utilizadas na realização das etapas de laboratório deste trabalho.

A *seção resultados e discussão* descreve, inicialmente, como se verificou qual linhagem de *Monascus* é a mais adequada à produção – isto é, com a maior produção e produtividade de pigmentos e a menor produção possível de citrinina. Foi também determinada a melhor forma de extrair pigmentos de *Monascus* para a preparação de extratos concentrados. Em seguida, trabalhou-se com a formulação de meios de cultivo adequados à produção industrial, levando em conta o custo da matéria prima e o rendimento do processo. Definido o substrato, determinou-se as condições de fermentação mais adequadas para fermentação em substrato sólido, em termos de aeração. A etapa seguinte consistiu em estudos de respirometria, em que dados cinéticos e de metabolismo do microorganismo puderam ser verificados, analisando-se a produção de pigmentos e de biomassa como função do tempo de fermentação e o consumo de oxigênio. Essa etapa de respirometria foi repetida para uma escala maior de produção, utilizando um reator tipo tambor horizontal. Os resultados dessa etapa foram confrontados com os obtidos em coluna, em frascos e em bandeja. Finalmente, verificou-se como é a estabilidade dos pigmentos em soluções aquosas, com o objetivo de estimar a aplicabilidade desses pigmentos em alimentos.

A *seção conclusão e sugestões* sumariza as principais informações levantadas a partir dos experimentos realizados, e apresenta novos rumos a se tomar dentro desta linha de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pigmentos – visão geral

2.1.1 Terminologia

A palavra “pigmento” tem origem latina e originalmente denominava uma cor (no sentido de matéria corante), mas foi mais tarde estendida para indicar adereços coloridos (maquiagem, por exemplo). No início da Idade Média, a palavra foi usada também para descrever os mais diversos tipos de extratos de plantas e vegetais, especialmente aqueles usados para coloração de alimentos. A palavra pigmento ainda vem sendo usada nesse sentido na terminologia biológica: matéria corante presente em animais ou plantas e que ocorre em grânulos dentro das células ou membranas celulares, como depósitos nos tecidos, ou suspensa nos fluidos corpóreos (Ullmann, 1985).

O significado moderno associado à palavra “pigmento” (em inglês, *pigment*) foi originado no século XX, significando uma substância constituída de pequenas partículas que é praticamente *insolúvel* no meio aplicado, e é usada devido às suas propriedades corantes, protetivas ou magnéticas (Ullmann, 1985). Essa definição aplica-se bem aos pigmentos de origem mineral, como dióxido de titânio ou negro de fumo; para materiais corantes solúveis, geralmente compostos orgânicos, é mais adequado usar a expressão “corante” (em inglês, *dye*). No entanto, ambos os termos (corante e pigmento) são usados para denominar substâncias usadas para conferir cor a alimentos, às vezes indistintamente. No presente trabalho, para manter consonância com os termos usados na literatura técnica, prefere-se citar substâncias corantes vegetais ou animais, indistintamente de sua solubilidade ou insolubilidade, como *pigmentos*.

2.1.2 Histórico

Pigmentos naturais inorgânicos provavelmente vêm sendo usados desde os tempos pré-históricos, o que se pôde verificar analisando pinturas em cavernas. Carvão vegetal, ocre, marrom de manganês e argilas estão entre os materiais

usados em pinturas de mais de 30000 anos em cavernas do sul da França, norte da Espanha e norte da África. Há cerca de 2000 anos, alguns desses pigmentos já eram aquecidos para modificar sua coloração, aumentando assim a variedade de pigmentos disponíveis. Com o desenvolvimento da alquimia e da química, diversos compostos inorgânicos de forte coloração (como o cinábrio, os sulfetos metálicos, os óxidos de chumbo, etc.) foram usados extensivamente como pigmentos, embora a maioria seja insolúvel.

Os pigmentos orgânicos naturais são também conhecidos há bastante tempo, destacando-se os extratos de plantas como o açafrão e o índigo, ou de animais como a cochonilha. Até meados do século XIX, os pigmentos orgânicos naturais eram os mais importantes tanto para alimentos e cosméticos quanto para a indústria têxtil; a indústria de tintas sempre pôde contar com vários pigmentos inorgânicos que são, no entanto, tóxicos para o consumo humano. Após 1850, com a síntese da malva por W. Perkins, houve o florescimento da indústria de pigmentos orgânicos e, em contrapartida, o recrudescimento de agroindústrias tradicionais como o índigo, na Índia. A variedade de novos pigmentos orgânicos sintéticos fez com que muitos fossem aplicados sem grande preocupação com a toxicidade. Em 1900, cerca de 80 pigmentos artificiais eram usados em alimentos – nessa época, não havia regulação quanto ao uso ou à pureza dessas substâncias; hoje, por outro lado, a maioria desses pigmentos tem uso vetado para alimentos (FDA, 1998).

2.1.3 Por que usar corantes em alimentos?

A cor é uma propriedade importante dos alimentos, e a natureza nos ensina cedo a esperar certas cores em determinados alimentos. Nossa aceitação de alimentos no futuro acaba dependendo grandemente dessa expectativa. No entanto, diversos fatores como sazonalidade, armazenamento e efeitos de processamento podem alterar a cor de um alimento, o que requer que um fabricante adicione corantes para satisfazer a expectativa dos consumidores.

As razões para adicionar corantes a alimentos incluem (FDA, 1998):

- reforçar a cor perdida devido à exposição à luz, ao ar, e a extremos de temperatura, umidade e condições de armazenamento.
- corrigir variações naturais da cor (embora mascarar qualidade inferior seja

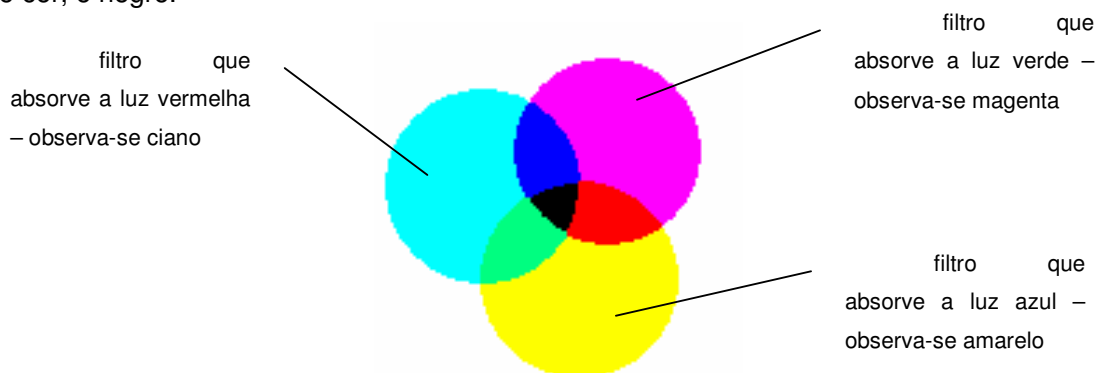
inaceitável).

- reforçar cores que ocorrem naturalmente, mas em níveis menores do que aqueles associados a um determinado alimento.
- conferir cor a alimentos que, de outra forma, seriam quase incolores.
- conferir cores vivas a alimentos “divertidos”, como doces festivos.
- proteger aromas e vitaminas que podem ser afetados pela luz do sol durante o armazenamento.
- fornecer uma variedade atrativa de alimentos ao consumidor.

2.1.4 Cor e estrutura

A cor de cada pigmento está associada à absorção ou reflexão da luz em comprimentos de onda determinados, o que é uma característica da molécula do pigmento. A interferência com a luz visível está associada a transições eletrônicas dos elétrons de valência (Gordon, 1995): a energia (e conseqüentemente a frequência, e portanto a cor) da luz está associada à diferença de energia envolvida entre os estados dos elétrons nessas transições. A cor percebida depende da cor absorvida, de acordo com a complementaridade das cores (Figura 1).

Figura 1 – cores primárias subtrativas absorvem comprimentos de onda determinados. Cada círculo representa um filtro absorvendo cor, por isso a combinação das cores é a ausência de cor, o negro.



As cores primárias subtrativas são o amarelo, o ciano e a magenta. Assim, se da luz branca for absorvido o componente amarelo, percebe-se a cor azul; de forma análoga, quando a cor de um composto é amarela, esse composto deve absorver luz no comprimento de onda correspondente ao azul (Bodner e Pardue, 1995). É por

isso que, para a análise de pigmentos vermelhos, a absorção máxima se dá para comprimentos de onda baixos – correspondendo ao azul, e vice-versa.

A absorção de fótons de luz com energias específicas é um fenômeno bem conhecido e explorado em técnicas de análise como a espectrofotometria. Na prática, quando se trata de substâncias corantes, há bandas de absorção – faixas de comprimentos de onda, ao invés de linhas espectrais como em íons inorgânicos simples. No entanto, o princípio de “formação” da cor é o mesmo (Figura 2).

Figura 2 – O espectro eletromagnético na faixa visível. Comprimentos de onda maiores (700nm) correspondem ao vermelho, enquanto comprimentos de onda menores (400nm) correspondem ao violeta.



A energia requerida por elétrons capazes de excitação depende do orbital que esses elétrons ocupam. A energia requerida é menor (e, portanto, maiores comprimentos de onda, menos energéticos, serão adequados) quando duplas ligações ocorrem. Se uma série de duplas ligações conjugadas está presente, a energia de excitação é ainda menor, a ponto de poder ser promovida pela luz visível – portanto, pode-se observar cor. À medida que o comprimento do sistema de duplas ligações conjugadas aumenta, o comprimento de onda de máxima absorção também aumenta. (Margalith, 1992). Por exemplo, enquanto o antraceno (três anéis aromáticos lineares) é incolor, o naftaceno (4 anéis lineares) é laranja e o pentaceno (5 anéis lineares) é azul (MERCK, 1996). Em pigmentos naturais, esses sistemas conjugados são observados com frequência – por exemplo, nos carotenóides, compostos que conferem a cor a tomates, cenouras e outros vegetais. A formação de sistemas conjugados com heteroátomos como oxigênio ou nitrogênio (apresentando igualmente orbitais p conjugados) também é relevante em compostos como quinonas, índigo e carmim.

2.1.5 Pigmentos naturais versus artificiais

A partir de meados de 1850, com a síntese da malva (o primeiro pigmento sintético), a prática de colorir alimentos tomou um impulso tão expressivo que o aspecto toxicológico dos corantes nem sempre era considerado. Em alguns casos, no entanto, existe razoável toxicidade, e desde 1971, o efeito cancerígeno de substâncias diversas no organismo humano vem sendo estudado (Nazaré, 2001).

Dúvidas crescentes concernentes à segurança de vários corantes artificiais vêm estimulando a sua substituição por corantes naturais (Kim *et al.*, 1995). Alguns dos corantes artificiais, como azorubrina ou tartrazina, podem causar alergias (Multon, 1992, in Fabre, 1993); mesmo a lista de corantes artificiais permitidos vem diminuindo devido a novas informações sobre efeitos adversos de um ou outro corante. Há 9 corantes artificiais correntemente permitidos em medicamentos, alimentos e cosméticos (“FD&C colors”) nos EUA, dos quais dois têm uso restrito. Por outro lado, há 21 tipos de corantes naturais (dos quais cinco têm uso restrito), liberados para os mesmos usos. Esses corantes naturais são de fontes diversas: desde sucos de frutas e vegetais e extratos (como o de casca de uva, por exemplo), até caramelo, o corante mais usado (FDA, 1998). A tabela na próxima página (Tabela 1) mostra os corantes permitidos para alimentos segundo a legislação brasileira, pelo estabelecido na Resolução nº 4, da ANVISA, de 24 de novembro de 1988. Essa resolução foi adaptada em termos de *quantidades* permitidas de cada corante, por classe de alimento, através de resoluções posteriores de 1999, 2000 e 2001. (Anvisa, 2004).

Tabela 1 – Corantes de uso permitido em alimentos e bebidas no Brasil (ANVISA, 2004)

Corantes naturais	Corantes sintéticos idênticos aos naturais	Corantes artificiais
Açafrão	Beta-caroteno, Beta-apo-8'-carotenal, Éster etílico do ácido Beta-apo-8'-carotenóico	Amarelo crepúsculo
Ácido carmínico		Azul Brilhante
Antocianinas		Bordeaux S ou Amaranto
Cacau		Eritrosina
Carmin		Indigotina
Carotenóides: α , β e γ -caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno		Ponceau 4R
Carvão vegetal		Tartrazina
Clorofila, clorofilas e clorofilinas cúpricas e seus sais		Vermelho 16.035
Choconilha		
Cúrcuma, Curcumina		Corantes caramelo
Hemoglobina		
Índigo		Corantes Inorgânicos
Páprica		Alumínio
Riboflavina	Riboflavina e riboflavina – 5 – fosfato de sódio	Carbonato de cálcio
Urucum		Dióxido de titânio
Urzela: orceína, orceína sulfonada		Ouro
Vermelho de beterraba		Óxidos e hidróxidos de ferro
Xantofilas: cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violaxantina	Xantofilas: cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violaxantina	Prata

A análise da Tabela 1 mostra que a legislação brasileira permite o uso de diversos pigmentos naturais, mas é bastante restritiva com relação aos artificiais, com apenas 8 pigmentos artificiais liberados para uso em alimentos.

A tabela a seguir (Tabela 2) mostra os corantes correntemente permitidos para uso em alimentos na União Européia (EU) (Arlt, 1998).

Tabela 2 – Corantes permitidos na União Européia para uso em alimentos (Arlt, 1998)

Uso <i>at quantum satis</i> em qualquer alimento^a	Uso permitido até um nível máximo, em alguns alimentos específicos	Uso restrito, permitido apenas para alguns alimentos
Riboflavina (E101)	Curcumina (E100)	Amaranto (Vermelho Bordeaux) (E123)
Clorofilas e clorofilinas (E140)	Amarelo Tartrazina (E102)	Eritrosina (E127)
Complexos de cobre de clorofilas e clorofilinas (E141)	Amarelo de quinolina (E104)	Vermelho 2G (E128)
Caramelo (E150a)	Amarelo crepúsculo FCF, laranja crepúsculo S (E110)	Marron FK (E154)
Caramelo sulfito (E150b)	Cochonilha, ácidos carmínicos, carmins (E120)	Cantaxantina (E161g)
Caramelo amônia (E150c)	Azorubina, carmoisina (E122)	Alumínio (E173)
Caramelo sulfito-amônia (E150d)	Vermelho Ponceau 4R, Vermelho cochonilha A (E124)	Prata (E174)
Carvão vegetal (E153)	Vermelho allura AC (E129)	Ouro (E 175)
Carotenóides (E160a)	Azul marinho V (E131)	Litorubina BK (E180)
Extrato de páprica, capsantina, capsorubina (E160c)	Indigotina, índigo carmin (E132)	Urucum, bixina, norbixina (E160b)
Vermelho de beterraba, betaninas (E162)	Azul brilhante FCF (E133)	
Antocianinas (E163)	Verde S (E142)	
Carbonato de cálcio (E170)	Negro brilhante BN, negro PN (E151)	
Dióxido de titânio (E171)	Marron HT (E155)	
Óxidos e hidróxidos de ferro (E172)	Licopeno (E160d)	
	Beta 8'-carotenal (C30) (E160c)	
	Éster etílico de ácido beta-apo-8'-carotenóico (C30) (E160f)	
	Luteína (E161b)	

a – uso “*at quantum satis*”: tanto quanto necessário, dentro das boas práticas de fabricação.

A análise da Tabela 2 mostra que, enquanto vários pigmentos naturais apresentam uso liberado na quantidade necessária em alimentos, nenhum dos pigmentos artificiais (destacados na tabela) tem uso irrestrito: devem ser usados em quantidades limitadas. A legislação vigente nos EUA, EU e Brasil, exemplificada através da Tabela 1 e da Tabela 2, mostra claramente que o mercado de pigmentos naturais é bastante promissor, inclusive porque os pigmentos naturais ora permitidos não cobrem toda a faixa espectral (Vargas, 2000). No entanto, é interessante notar

que, presentemente, o uso de pigmentos de *Monascus* como aditivo intencional de cor *não está* previsto pela legislação vigente nos EUA, EU e Brasil.

2.1.6 Pigmentos microbianos

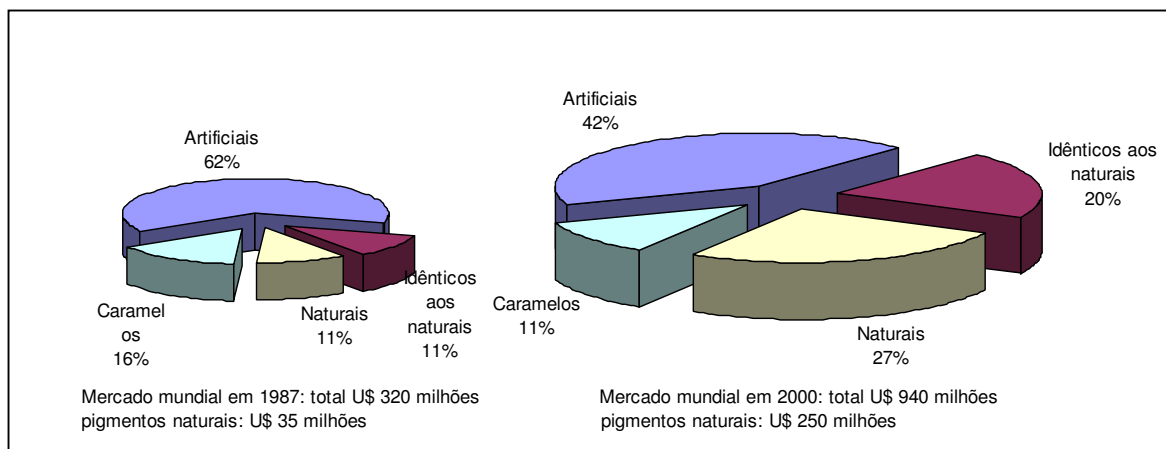
Pigmentos microbianos são uma classe de pigmentos naturais que apresenta vantagem em termos de produção em relação aos seus similares extraídos de vegetais ou animais: o desenvolvimento de espécies vegetais superiores é mais lento que a de microorganismos e algas. Assim, a produção de pigmentos por bioprocessos envolvendo microorganismos, cuja velocidade de crescimento é relativamente alta, pode garantir uma produtividade tal para o processo que o torna vantajoso. Correntemente, os pigmentos produzidos por via microbiana e utilizados comercialmente são a riboflavina (vitamina B₂, um pigmento amarelo de uso permitido na maioria dos países), por *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypi*; os pigmentos de *Monascus* (objeto deste trabalho, discutidos à frente), por *M. purpureus* e *M. ruber*; carotenóides (pigmentos amarelos produzidos por diversos microorganismos, mas que até o momento só são economicamente viáveis quando produzidos por microalgas) como β -caroteno (por *Dunaliella salina* e *D. bardawil*) e astaxantina (por *Haematococcus pluvialis*); e ficobiliproteínas como a ficocianina (um pigmento azul usado em alimentos e cosméticos, produzido por *Spirulina sp.*; os que apresentam potencial de uso são os indigóides, as antraquinonas e naftoquinonas (Jacobson e Wasileski, 1994).

2.1.7 Mercado de pigmentos

O mercado para pigmentos naturais produzidos por bioprocessos é difícil de estimar; por um lado, existe uma preferência cada vez maior por aditivos naturais em alimentos e cosméticos; por outro, a via de produção natural pode ser, em alguns casos, 10 vezes mais cara que a via sintética. O caso mais bem sucedido é o do β -caroteno produzido por microalgas, que tem um custo de cerca de U\$1000/kg contra U\$ 500/kg por via sintética; apesar do preço maior, o β -caroteno produzido por via biotecnológica pode competir em nichos onde é importante que todos os ingredientes sejam “naturais”; além disso, o pigmento microbiano é uma mistura de isômeros cis- e trans, com efeitos terapêuticos contra o câncer que o β -caroteno

sintético, predominantemente cis-, não apresenta. O mercado para pigmentos no mundo foi estimado, em 1987, em U\$ 320 milhões – dos quais cerca de 1/3 (U\$120 milhões) era de corantes naturais ou idênticos a naturais. Desses, por sua vez, cerca de U\$ 35 milhões eram de corantes extraídos de fontes naturais, U\$35 milhões de idênticos aos naturais e U\$ 50 milhões em corantes derivados de processamento (como caramelos). Como o mercado de pigmentos, similarmente ao de aromas, tem tido um crescimento de aproximadamente 10% ao ano (Jacobson e Wasileski, 1994), o mercado atual deve ser expressivamente maior, algo entre U\$700 milhões e U\$1,5 bilhões. De fato, de acordo com Downham e Collins (2000), uma razoável estimativa para o mercado global de alimentos hoje é da ordem de U\$ 940 milhões, distribuídos em 400 milhões para pigmentos sintéticos, 250 milhões para pigmentos naturais, 189 milhões para pigmentos idênticos aos naturais e 100 milhões para caramelos (Figura 3).

Figura 3 - Participação de cada classe no mercado mundial de pigmentos, em 1987 e 2000



Nota-se, analisando a Figura 3, que a participação proporcional dos pigmentos naturais aumentou nas últimas décadas. Enquanto a produção mundial de pigmentos aumentou cerca de 3 vezes entre 1987 e 2000, a produção de pigmentos naturais aumentou mais de 7 vezes no mesmo período.

Os maiores mercados para pigmentos são a Europa e os Estados Unidos. A distribuição de consumo não é proporcional ao consumo de alimentos, porque pigmentos são usados em alimentos *processados*: existe uma demanda potencial grande em países em desenvolvimento, como o Brasil, nos quais uma melhora no

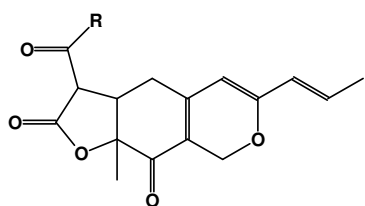
perfil econômico deve garantir o aumento no consumo de alimentos processados.

No caso específico de pigmentos de *Monascus*, o consumo anual desses pigmentos no Japão subiu de 100 t em 1981 para 600 t em 1992 e foi avaliado em cerca de U\$12 milhões, de acordo com um levantamento publicado nesse mesmo ano (Lee *et al.*, 1995; Hajjaj *et al.*, 1997)

2.2 Pigmentos de Monascus

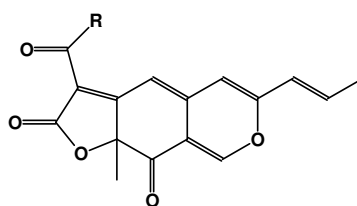
Pigmentos de *Monascus* são usados há centenas de anos como corantes para alimentos, em países orientais. Os fungos do gênero *Monascus* produzem uma série de pigmentos policetídicos de estruturas relacionadas (Figura 4). Embora por muito tempo se tenha reconhecido que há 6 pigmentos, na última década foram descobertos alguns novos, como a xantomonascina e o amarelo II, possivelmente derivados da rubropunctatina (Sato *et al.*, 1992; Jűszlová *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1997). Recentemente duas novas estruturas, chamadas monascopiridinas A e B, análogos hidrogenados dos pigmentos vermelhos, foram descritas. Esses compostos apresentam máximos de absorção em UV a 306 nm, e a sua contribuição na coloração de *Monascus* ainda não foi investigada (Wild *et al.*, 2003). Segundo alguns autores, há mais de 10 pigmentos, embora nem todos de estrutura conhecida (Shin *et al.*, 1998).

Figura 4 – estruturas de pigmentos de *Monascus* sp.



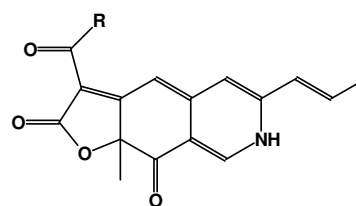
R = C₅H₁₁ – monascina

R = C₇H₁₅ – ankaflavina
(amarelo)



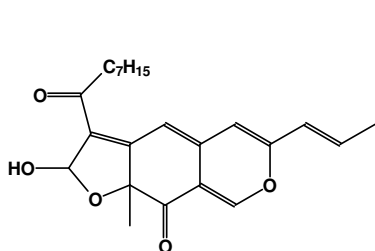
R = C₅H₁₁ – rubropunctatina

R = C₇H₁₅ – monascorubrina
(laranja)

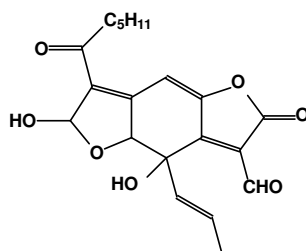


R = C₅H₁₁ – rubropunctamina

R = C₇H₁₅ – monascorubramina
(vermelho)

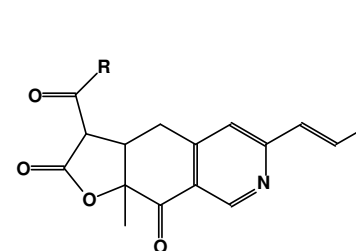


Amarelo II
(amarelo)



R = C₅H₁₁ – xantomonascina A

R = C₇H₁₅ – xantomonascina B
(amarelo)



R = C₅H₁₁ – monascopiridina A

R = C₇H₁₅ – monascopiridina B

Os pigmentos alaranjados, monascorubrina e rubropunctatina, são sintetizados no citosol a partir da acetil coenzima A, pelo complexo multienzimático policetídeo sintase. Esses pigmentos não são hidrossolúveis e são instáveis em pH extremos (Hajjaj, 2000), mas apresentam estruturas responsáveis pela sua alta afinidade com compostos contendo grupos amino primários (são por isso chamados de aminófilos). Reações com aminoácidos levam à formação de pigmentos vermelhos hidrossolúveis, monascorubramina e rubropunctamina. O mecanismo de formação dos pigmentos amarelos não está ainda claro; alguns autores consideram que estes são produtos da alteração dos pigmentos alaranjados, enquanto outros acreditam que se trata de pigmentos com uma rota metabólica própria (Lin e Demain, 1991; Jůzlová *et al.*, 1996). A via metabólica das policetídeo sintases é razoavelmente bem conhecida, mas elucidar os detalhes da biossíntese de pigmentos de *Monascus* é necessário para permitir melhor manipulação das

condições e composição do meio de cultivo, com base no metabolismo do fungo. Há trabalhos sobre análogos de pigmentos de *Monascus* produzidos por um fungo de outro gênero, *Penicillium* sp. AZ, usando vias metabólicas similares (Ogihara *et al*, 2000).

Devido à afinidade por grupos amino, os pigmentos de *Monascus* estão associados freqüentemente a proteínas (Wong e Koehler, 1981) ou à parede celular, formando um complexo que pode ser de difícil extração. Outros autores consideram que pode haver fixação dos pigmentos a lipídios da biomassa fúngica, de forma que a extração envolveria rompimento celular e dissolução em solvente orgânico (St. Martin *et al*, 1990). Ainda devido a essa afinidade por grupos amino, é possível converter pigmentos alaranjados lipossolúveis em pigmentos vermelhos hidrossolúveis por reação com aminoácidos e compostos análogos *in vitro* (St. Martin *et al*, 1991). Nesse caso, o nitrogênio do grupo amino (do aminoácido ou análogo) substitui o oxigênio do anel da rubropunctatina ou da monascorubrina, fornecendo análogos da rubropunctamina ou da monascorubramina, mas com um radical ligado ao N em substituição ao H dos pigmentos vermelhos naturais.

Entre os possíveis aminoácidos que podem ser usados para induzir a formação de pigmentos hidrossolúveis *in vivo* está o ácido glutâmico, na forma de glutamato monossódico (MSG) (Lin e Demain, 1992). Em um estudo usando glucose como fonte de carbono em um meio líquido contendo MSG, observou-se a formação de N-glucosil derivados dos pigmentos vermelhos, correspondendo a até 10% dos pigmentos totais (Hajja *et al*, 1997).

Entre os pigmentos produzidos por *Monascus* são geralmente de maior interesse os vermelhos, que são possíveis substitutos de corantes sintéticos como a eritrosina (FD & C vermelho no. 3) (Johns & Stuart, 1991); trata-se de pigmentos estáveis na faixa de pH 2-10, termoestáveis e que podem ser autoclavados (op. cit. em Lin e Demain, 1992). Alguns estudos mostram que pigmentos de *Monascus* podem ser usados como substitutos de aditivos alimentares tradicionais, como nitritos e cochonilha, em patês e embutidos (Fabre *et al*, 1993). Há outros estudos em curso verificando resposta sensorial, testes de alergenicidade e toxicidade, embora países orientais como o Japão façam uso extensivo desses pigmentos há muitas décadas – por exemplo, pigmentos amarelos hidrossolúveis para doces (Watanabe *et al*, 1997), ou pigmentos vermelhos para vinho de arroz.

2.3 O microorganismo

2.3.1 Ocorrência

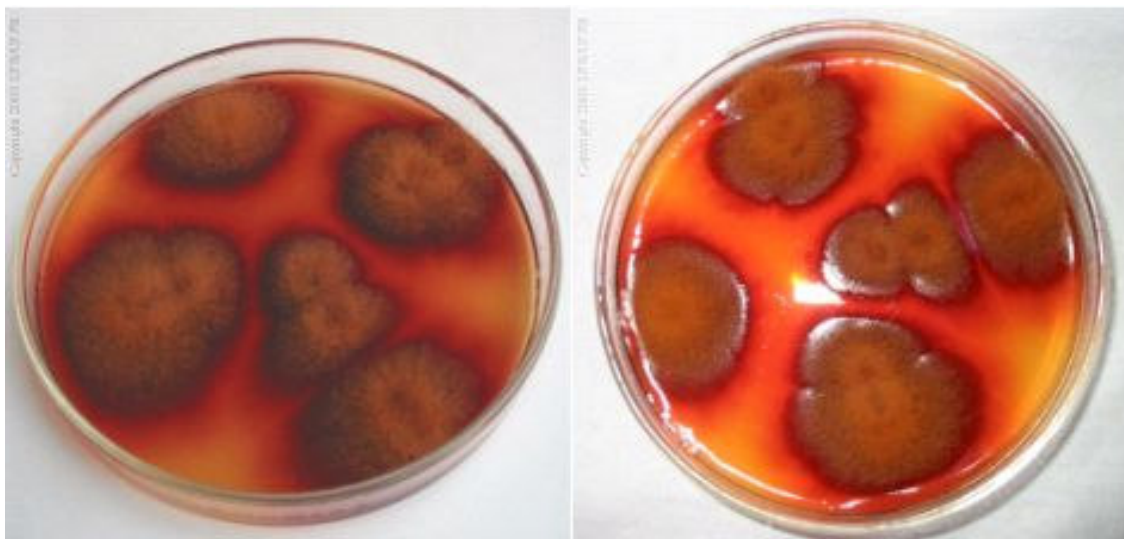
Facilmente encontrado em diversos ecossistemas, fungos do gênero *Monascus* são usados tradicionalmente em países orientais, originalmente na China e Tailândia, para preparar um arroz fermentado de forte coloração vermelha e que encontra aplicações diversas, desde conferir cor a outros produtos como vinho, queijo e carne, até usos medicinais e como preservativo de carne (Wong e Koehler, 1981). Enquanto alguns metabólitos do fungo são importantes devido à forte coloração, outros possuem atividade hipocolesterêmica e antimicrobiana, e vêm sendo estudados com mais intensidade na última década (Martínková *et al*, 1995; Zhang *et al*, 2000). No momento, diversas empresas comercializam o arroz vermelho seco e pulverizado como um suplemento alimentar natural com capacidade para diminuir o colesterol, e outras vendem o produto seco ou os extratos purificados como corantes alimentícios (Allok, 2003).

O gênero *Monascus* compreende três espécies pertencentes à família *Monascaceae* e à classe *Ascomyceta* (*M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber*) (Pitt, 1997), cuja característica mais importante é a capacidade de produzir metabólitos secundários de estrutura policetídica (Jůzlová *et al*, 1996), alguns com forte pigmentação amarela, alaranjada ou vermelha. As duas primeiras espécies são mais importantes na produção de pigmentos, enquanto *M. ruber* é associado à decomposição de diversos alimentos. Uma espécie nova foi isolada de solo no Iraque, mas esta não é importante para alimentos (Pitt e Hocking, 1997).

2.3.2 Linhagens usadas para a produção de pigmentos

Cepas utilizadas: geralmente são isolados, provenientes do Japão, China, Tailândia ou Indonésia, de diversos alimentos fermentados: queijo de soja, koji vermelho para fabricação de queijo de soja ou kaoliang, e a fonte mais comum, angkak ou anka (arroz vermelho) (ATCC, 1987). As cepas variam na capacidade de produção e tonalidade dos pigmentos, além de outros fatores como velocidade de crescimento e o perfil de metabólitos. A temperatura, pH e umidade são fatores que alteram também pigmentação e crescimento do fungo.

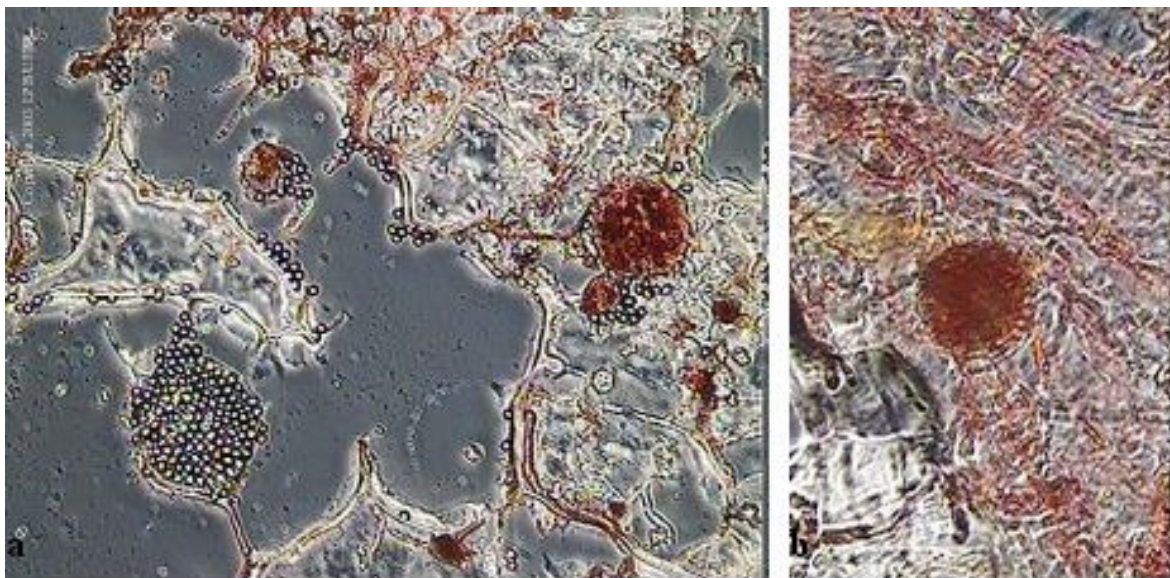
Figura 5 – cultura de *Monascus* em PDA, após 7 dias de incubação a 32°C. Nota-se o halo de difusão de pigmentos hidrossolúveis e a cor característica do micélio.



2.3.3 Morfologia

Colônias de 20 a 30 mm de diâmetro em PDA, após 7 dias. As colônias são planas, eventualmente com pequeno desenvolvimento aéreo, esparsas, com textura superficial floculenta, micélio inicialmente branco (1 a 2 dias), passando para laranja a vermelho pardo à medida que a cultura se desenvolve, com a formação de cleistotécios e aleurioconídias (Figura 5). Geralmente há formação de pigmentos solúveis que difundem-se pelo ágar. Os cleistotécios são esféricos, de 30 a 60µm de diâmetro, formados como um nó de hifas a partir de um “pedúnculo” bem definido, com paredes celulares tornando-se marrons com a maturação; ascósporos elipsóides, hialinos, 5-7 x 4-4,5µm, parede celular lisa (Figura 6). Pode haver formação de aleurioconídias em pedículos laterais às hifas, mas mais comumente terminais, às vezes nascendo isolados mas mais comumente em cadeias de até 10 células de comprimento, esféricas a piriformes, freqüentemente arredondando na maturação, com 10-14µm de diâmetro ou 10-18 x 8-14µm, com paredes espessas, lisas e marrons. A maioria das espécies produz também clamidoconídias e artrosporos. As colônias de *M. ruber* são de crescimento mais rápido que outras espécies (Pitt e Hocking, 1997).

Figura 6 - Cultura de *Monascus* observada ao microscópio (aumento de 400 vezes). Note em “a” um cleistotécio rompido e diversos esporos. Em “b”, observa-se a coloração difusa do micélio e um cleistotécio intacto.



2.3.4 Cepas utilizadas

Excluídas aquelas que são exclusivas de institutos de pesquisa, universidades ou empresas, as cepas mais referenciadas na literatura de *Monascus* são as listadas a seguir (Tabela 3). Note que a mesma cepa apresenta diversas denominações, dependendo da instituição em que está conservada. Algumas dessas cepas foram depositadas com um nome diferente do aceito hoje; a tabela mostra a denominação aceita em 2004, e algumas referências relacionadas especificamente com a produção de pigmentos (já que algumas linhagens foram usadas para estudos metabólicos e de produção de anti-hiperlipidêmicos).

Tabela 3 – Cepas mais utilizadas na pesquisa com *Monascus*, fonte de origem, sinonímia e algumas referências (em destaque, linhagens utilizadas neste trabalho).

Cepa	Espécie, origem e depositante	Referências
ATCC16360 CBS 283.34 ATCC 26311 IFO 4478	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado no CBS. Isolado de Angkak (grãos de arroz fermentado)	Miyake <i>et al.</i> , 1984
ATCC 16362 CBS 285.34 ATCC 36927 DSM 1603 IFO 4485	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado no CBS. Isolado de Angkak (grãos de arroz fermentado)	Sheperd e Carels, 1979 Rosenblitt <i>et al.</i> 2000.
ATCC 16365 CBS 109.07 ATCC 16426 IFO 4513 IMI 210765 NRRL 1596	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado no CBS. Isolado de Angkak (grãos de arroz fermentado), Java	Sheperd e Carels, 1979 Miyake <i>et al.</i> , 1984
ATCC 16367 CBS 288.34 DSM 1604 IFO 4484	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado no CBS. Isolado de kyokusi (massa de leveduras fermentadas, China)	Sheperd e Carels, 1979
ATCC 16427 NRRL 2897	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado no NRRL.	Sheperd e Carels, 1979 Broder e Koehler, 1980.
ATCC 16435 NRRL 1991	<i>Monascus</i> sp. depositado no NRRL. Isolado de koji para manufatura de vinho tinto de arroz, China.	Sheperd e Carels, 1979
ATCC 36928 IFO 6540 CCT 3802	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado no IFO.	Yamaguchi <i>et al.</i> 1973 Miyake <i>et al.</i> , 1984 Miyashira <i>et al.</i> , 2003
ATCC 96218 MR1	<i>Monascus purpureus</i> Went depositado na ATCC. Por PJ Blanc Isolado de arroz fermentado, China	Santerre <i>et al.</i> , 1994 Fabre <i>et al.</i> , 1993

Fonte: ATCC, março de 2004

2.4 Crescimento e produção de metabólitos

O crescimento e produção de metabólitos dos fungos do gênero *Monascus* se dão em condições diversas. Há vários meios de cultivo adequados, mas os mais comuns são PDA (ágar batata dextrosada) e MEA (ágar extrato de malte) (ATCC, 2004). O crescimento se dá de 15-18°C (mínimo) até cerca de 45°C (máximo), (Pitt e Hocking, 1997) com a produção de pigmentos variando largamente com a espécie e com as condições de cultivo. Entre os metabólitos importantes de *Monascus* estão os pigmentos já descritos, a citrinina (uma micotoxina que será abordada adiante), e

uma série de substâncias anti-hiperlipidêmicas como monacolinhas K e L (Ma *et al*, 2000), que não serão discutidas neste trabalho. Durante o cultivo de *Monascus*, CO₂, etanol e acetato também são produzidos. Ao trabalhar com FSS em arroz, Rosenblitt *et al* (2000) mostraram que ao final de uma fermentação de 240h, o balanço de carbono é: cerca de 23% do carbono é convertido a biomassa, 35% a CO₂, 15% a etanol, 1% a ácido acético e 17% permanece não convertido. Esses resultados contabilizam 91% da fonte de carbono; a diferença (para 100%) é provavelmente devida a mudanças nas vazões de aeração e uma subestimação do etanol produzido.

2.4.1 Condições físicas de cultivo:

Temperatura: A faixa de temperatura ótima é, em média, de 28-32°C, em acordo com os registros de cada espécie em bancos de cepas, embora essa temperatura varie dependendo da linhagem entre 25°C e 37°C (Lin, 1991). No caso de *M. purpureus* CBS 109.7, por exemplo, a temperatura ótima é de 34°C; a temperatura mínima é de 18°C e a máxima, de 46°C (Rasheva *et al*, 1997). Essas temperaturas são ótimas para crescimento, mas para produção de pigmento geralmente uma temperatura mais alta é mais adequada.

Presença de oxigênio: Os fungos do gênero *Monascus* são incapazes de crescimento estritamente anaeróbico usando glicose como substrato, mas podem crescer em condições de limitação de oxigênio. Nessas condições, aumenta a produção de etanol e de CO₂, mas há menor produção de pigmento; em condição de maior aeração, a produção de etanol diminui enquanto a de pigmento aumenta. Observou-se ainda que um aumento na pressão parcial do CO₂ aumenta a produção de pigmento (Pastrana *et al*, 1995). Em altas concentrações de glicose (acima de 20g/L, em cultura líquida) ocorre um efeito tipo Crabtree, isto é, o desvio para um metabolismo predominantemente anaeróbico, com a produção de etanol, mesmo em condições de boa aeração (Chen e Johns, 1994). Com concentrações mais baixas de glicose ou com outros açúcares, é possível dividir a produção em duas fases: inicialmente a glicose sendo convertida a etanol e biomassa, e em seguida o etanol sendo convertido a biomassa e pigmento (Hamdi *et al*, 1996). Em um meio de composição definida, em condições de limitação de oxigênio, a produção de

pigmentos vermelhos é associada ao crescimento, enquanto em excesso de oxigênio a produção de pigmentos pode ser inibida pelo efeito de um produto desconhecido (Hajjaj *et al*, 2000). A influência da concentração de oxigênio em fermentação em substrato sólido também foi investigada; a uma pressão de 0,02 atm CO₂, um aumento da pressão parcial de oxigênio até 0,5 atm forneceu alto rendimento em pigmentos, enquanto baixas pressões de CO₂ com pressão de 0,21 atm de O₂ forneceu rendimento ainda maior (Han e Mudgett, 1992).

pH inicial: Em diferentes trabalhos observou-se crescimento em uma ampla faixa de pH, desde 2,5 até 8,0, sendo a faixa ideal de 4,0 a 7,0 (Yongsmith *et al*, 1993). Dentro dessa faixa a variação no crescimento é pequena, com desempenho ligeiramente melhor em pH 4,0 (Lin *et al*, 1991; Chen e Johns, 1993). Embora o crescimento seja melhor em pH 4, o rendimento em biomassa é maior em pH 6,5 (Chen e Johns, 1993). A produção de pigmentos é afetada de forma diversa, sendo que em pH mais baixo há predominância de coloração amarela e em pH mais alto predominância de coloração vermelha. Em pH 2,5 há produção principalmente de um pigmento amarelo brilhante com esqueleto semelhante ao dos pigmentos tradicionais (Yongsmith *et al*, 1993); em pH 4 há favorecimento da produção de ankaflavina (amarelo), e a produção total de pigmentos aumenta com o aumento de pH até 5,5; acima desse valor, há diminuição na produção de pigmentos (Lin *et al*, 1991), embora a produção de pigmento vermelho seja maior em relação aos amarelos. Em pH 7, já não há produção importante de pigmentos amarelos (Yongsmith *et al*, 1993).

pH durante o crescimento: A mudança de pH durante o crescimento depende das fontes de nitrogênio, em primeiro lugar, e em segundo das de carbono. Independentemente do pH inicial, o pH final tende a ser o mesmo (Juslová, 1996), na faixa de 7 a 8. (Yongsmith *et al*, 1993).

2.4.2 Fermentação em meio sólido/submerso

Embora a produção tradicional de angkak para uso como corante seja sobre um suporte sólido (arroz), a maioria dos estudos feitos em laboratório foi realizada com meios de cultivo líquidos. Ocorre que na fermentação sólida, embora obtenha-se produtividade de pigmento muito maior que na submersa, geralmente são

utilizados meios naturais de formulação complexa, o que dificulta as análises necessárias para desvendar rotas metabólicas e outros fatores durante o crescimento. Em um estudo foram comparados meios líquidos com meios sólidos de mesma composição, obtidos pela adição de gelificante ao meio líquido e extrusão em partículas com tamanho próximo às de arroz. Os meios sólidos assim preparados forneceram produção até três vezes maior de pigmento que o meio líquido, mas os cultivos feitos em arroz ainda foram superiores (Johns e Stuart, 1991).

2.4.3 Teor de umidade em meios sólidos

O processo tradicional de produção de angkak é o mesmo usado para outras variedades de koji (arroz fermentado com diferentes espécies de fungos, geralmente *Aspergillus*), daí o nome alternativo "koji vermelho". O processo de produção consiste em manter arroz não aglutinante imerso em água por até 24h, com posterior cozimento por vapor (ou, mais recentemente, autoclavagem), adição de um inóculo (uma porção de arroz anteriormente fermentado), e adição de água a intervalos determinados para manter a umidade. (Palo *et al*, 1960; Wong e Koehler, 1981). A umidade exigida na fermentação de arroz varia dependendo da descrição tradicional, mas recomenda-se que a umidade seja suficiente para garantir o crescimento do micélio pelo grão sem a desintegração dos grãos. O teor de umidade ideal para a produção de pigmentos é da faixa de 56%, com pH 6, segundo Johns e Stuart (1991).

2.4.4 Composição do meio de cultivo

Fontes de carbono diversas vêm sendo usadas como substrato para o crescimento de *Monascus*, sendo as mais comuns a glucose, a sacarose e o amido. O melhor crescimento geralmente é observado com glucose (St. Martin *et al*, 1990). A produção de pigmentos, no entanto, depende de fatores diversos como a natureza e a concentração do substrato, além da fonte de nitrogênio e do pH. A produção volumétrica de pigmento em meio submerso é melhor com amido e dextrina, enquanto a produção específica é melhor com maltose e quase tão boa quanto com glucose (Lin e Demain, 1991), mas essa comparação entre açúcares deve ser feita

verificando-se cuidadosamente as concentrações. Em concentrações de glucose inferiores a 20g/L, o crescimento e a produção de pigmento vermelho são excelentes; concentrações de glucose superiores a 20g/L levam a um comportamento tipo “Crabtree”, com produção significativa de etanol, e crescimento celular e produção de pigmento reduzidos, mesmo em presença de oxigênio. Isso indica que pode haver efeito repressor da glucose – e que o uso de outro açúcar pode evitar esse efeito. De fato, em altas concentrações (50g/L), a maltose é melhor que a glucose, especialmente em presença de peptona. Essas diferentes concentrações de açúcares têm mais efeito sobre os pigmentos amarelos que vermelhos, embora quando se use maltose a produção de pigmentos vermelhos seja estimulada. (Chen e Johns, 1994). Uma boa fonte alternativa de carbono é o etanol (Júzlová *et al*, 1996), que é, afinal, produzido naturalmente pelo fungo em condições de limitação de oxigênio ou excesso de glucose (Pastrana *et al*, 1995; Hamdi *et al*, 1997). Como a produção de biomassa é favorecida com o uso de carboidratos, pode-se fazer a cultura em dois estágios (por exemplo, maltose-etanol) para aumentar a eficiência no uso de etanol para produção de pigmentos (Juszlová *et al*, 1996). Há algumas contradições no que se refere ao efeito de fontes de carbono; por exemplo, Lin e Demain (1991) não encontraram efeito repressor para nenhuma fonte de carbono, trabalhando com concentrações de até 10% de carboidratos. Essas contradições podem ser possivelmente atribuídas a diferenças entre organismos e taxas de aeração empregadas.

Fontes de nitrogênio usadas para o crescimento de *Monascus* vão desde nitrogênio inorgânico (amônia e nitratos) até peptonas (Carvalho *et al*, 2003). Na produção tradicional de angkak, não há necessidade de adição de fonte de nitrogênio, já que o arroz possui de 5 a 8% de proteínas, (base seca) (Franco, 1992). Ao usar outros substratos, a adição de uma fonte de nitrogênio (especialmente N orgânico) estimula a produção de pigmentos. Segundo Lin (1991) o uso de glutamato monossódico como fonte de nitrogênio estimula fortemente a produção de pigmentos, o que foi confirmado em diversos trabalhos posteriores por outros autores. O tipo de pigmento e a sua excreção pela célula são também relacionados à fonte de nitrogênio: usar nitrogênio orgânico, como em aminoácidos, favorece a formação de pigmentos vermelhos (Yongsmith *et al*, 1993; Juslová *et al*, 1996), e o uso de peptonas é melhor para a produção de pigmento e para o crescimento

celular, bem como para a secreção de pigmentos a pH 6,5 (Chen e Johns, 1993), embora o uso de polipeptonas favoreça a formação de pigmentos amarelos (Juzlová *et al*, 1996). Tentou-se justificar o efeito estimulante de aminoácidos sobre a produção ou liberação de pigmentos postulando que os derivados dos pigmentos, ligados a aminoácidos, são mais solúveis que os pigmentos originais. Na verdade, esse efeito dos aminoácidos sobre a produção ou liberação de pigmentos talvez não exista, ou deva ser explicado de outra forma, já que trabalhos usando vários aminoácidos revelaram que há forte influência, positiva ou *negativa*, de aminoácidos diversos sobre a produção de pigmento. O derivado com leucina, por exemplo, é hidrossolúvel e ainda assim causa repressão da produção de pigmento (Lin e Demain, 1994). O uso de nitrogênio inorgânico (nitratos, amônia e seus sais) estimula o crescimento celular (Lin e Demain, 1991), embora a amônia seja melhor que o nitrato (Chen e Johns, 1993). Estudos demonstram que o uso de amônia como fonte de nitrogênio pode favorecer a produção de pigmento alaranjado (Juzlová *et al*, 1996). Uma comparação das quantidades relativas e da qualidade de cor de pigmentos produzidos usando diversos aminoácidos mostra que pigmentos amarelos e alaranjados não são afetados pela fonte de nitrogênio, enquanto que os pigmentos vermelhos diferem em tonalidade e solubilidade (Jung *et al*, 2003).

2.4.5 Outros fatores nutricionais

Diversos outros fatores podem afetar o crescimento do fungo e a produção de pigmentos. Segundo Lin e Demain (1991), altas concentrações de fosfato e de sulfato de magnésio são inibidoras da produção de pigmentos; por outro lado, o crescimento é uma função linear e crescente da concentração de MgSO_4 , na faixa de 0,5-16mM.

A adição de óleo de milho estimula (dobra) a produção de pigmento, enquanto a adição de 0,4% de tween 80 não afeta o consumo de glicose nem retarda a taxa de crescimento, mas aumenta a produtividade de pigmento (6 a 8 vezes, atingindo 8535 unidades de absorbância/g matéria seca) (Chiu e Poon, 1993).

Meios de cultivo adequados para a produção de pigmentos de *Monascus* são os mais diversos, desde os de composição definida até os naturais; como este fungo

é um contaminante comum em grãos e isolado de diversos substratos com alta concentração de sólidos, trata-se de um fungo xerofílico (Pitt e Hocking, 1997), que cresce em uma larga variedade de substratos naturais. Alguns substratos naturais já experimentados, além do arroz e outros cereais, são o amido de mandioca (Yongsmith *et al*, 1993; Lee *et al*, 1995; Carvalho *et al*, 2001), o suco de figo da Índia (Hamdi *et al*, 1996), e o soro de leite (Kujumdzieva *et al*, 1997). Em alguns casos, como no amido de mandioca, é necessário suplementar esses substratos com extrato de levedura e peptonas, como fontes de vitaminas e nitrogênio orgânico. Os componentes dos meios de fermentação complexos usados, já discutidos no texto, compreendem uma série de açúcares (mais comumente glicose), oligoelementos e fontes de nitrogênio orgânico (aminoácidos, peptonas) ou inorgânico (amônio, nitratos). Um meio usado em alguns trabalhos é composto de: glucose 40g/L; NH_4NO_3 3 g/L; K_2HPO_4 6g/L; KH_2PO_4 6g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g/L; KCl 0,5g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3mg/L; pH final 6,3 (Wong 1981, op.cit. em Lin, 1991).

2.5 Métodos de fermentação

A fermentação em substrato sólido (FSS, também conhecida como fermentação em meio sólido, FMS e fermentação em estado sólido, FES) é um método tradicional de fermentação, usado há séculos para a produção de alimentos tradicionais orientais, como o próprio angkak (Pandey, 1992; Pandey *et al* 2000, 2001). Existem vantagens na produção de pigmentos de *Monascus* por FMS: é o habitat mais natural para fungos (Pandey, 2001; Soccol e Vandenberghe, 2003), com alta produtividade de pigmentos em processo relativamente barato – fermentação em bandejas, por exemplo. Esse método é o mais vantajoso quando o pigmento a ser usado pode conter resíduos do substrato como amido e fibras, bem como o próprio micélio.

Caso seja necessária apenas a fração corante – para uso em bebidas, por exemplo – o pigmento precisa ser extraído por um solvente orgânico, e em seguida o solvente deve ser evaporado, por exemplo em um *spray drier*. Nesse caso, pode ser interessante trabalhar com fermentação submersa, que embora apresente o pigmento diluído em um grande volume de líquido, pode ter a biomassa e outros

eventuais componentes insolúveis prontamente retirados por filtração, e em seguida pode-se efetuar a evaporação do solvente. Segundo Lee *et al* (1995), a produção de pigmentos de *Monascus*, embora tradicionalmente feita em fermentação sólida, é industrialmente levada a cabo em fermentadores submersos. Isso se deve ao fato de que a fermentação sólida é de difícil controle de aeração, umidade, temperatura e pH, enquanto que a fermentação submersa tem parâmetros controlados com facilidade; uma planta de fermentação submersa flexível pode usar o mesmo fermentador para culturas diversas, o que é interessante em termos operacionais. O controle de pH, por exemplo, pode permitir o direcionamento da fermentação no sentido de favorecer a produção de pigmentos vermelhos (Santerre *et al*, 1995). Ainda assim, pesquisa-se modelos de reatores e métodos de fermentação sólida devido ao potencial desta forma de operação. No caso de *Monascus*, inclusive, obteve-se produção até 3 vezes maior de pigmentos em meio sólido, comparado com meio líquido de mesma composição (Johns e Stuart, 1991). Mais recentemente, usou-se uma fermentação submersa com um bloco de amido de mandioca gelatinizado, numa tentativa de aumentar a concentração de açúcares usando esse substrato, que é barato e incolor. Usando o amido em um bloco, há bastante fonte de carbono disponível, mas sem aumentar a viscosidade do meio com amido livre, o que não compromete a transferência de oxigênio, sabidamente necessária (Lee *et al*, 1995). Fermentações usando mandioca e derivados em fermentação sólida são alternativas ao uso de arroz (Carvalho, 2001).

2.6 Toxicidade dos pigmentos e produção de citrinina

Diversos trabalhos foram já realizados com relação ao estudo da toxicidade de pigmentos de *Monascus*, que aparentemente são inócuos nas quantidades testadas. O longo tempo pelo qual os pigmentos de *Monascus* já vêm sendo usados depõem a favor da sua toxicidade baixa ou inexistente (Lin, 1991a). Por algum tempo, desde que os fungos do gênero *Monascus* começaram a ser estudados sistematicamente, acreditou-se que os pigmentos produzidos apresentavam também propriedades antibióticas; mais tarde, verificou-se que essa atividade deve-se principalmente a outra substância, chamada monascidina A (Wong e Koehler, 1981). Estudos posteriores mostraram que essa substância é na verdade a citrinina,

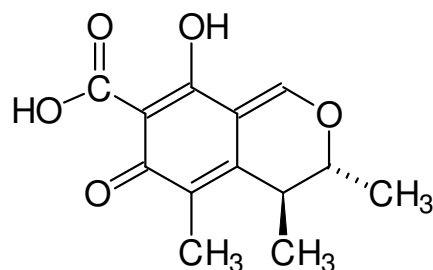
micotoxina de ação nefrotóxica produzida por diversos fungos (Blanc *et al.*, 1995a), e que nem todas as cepas de *Monascus* produzem citrinina. Verificou-se ainda que a fonte de nitrogênio usada pode influenciar a produção de citrinina: para a mesma cepa de *M. ruber* em meio sintético com etanol, a produção de citrinina vai de 0mg/L usando metionina como fonte de nitrogênio até a 100mg/L usando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (Blanc *et al.*, 1995). Finalmente, estudos sobre a toxicidade de frações purificadas dos pigmentos mostraram que há atividade biológica para os pigmentos de *Monascus*, especialmente os alaranjados e, em menor grau, os vermelhos (Martínková *et al.*, 1995).

Embora não haja uma conclusão definitiva sobre a toxicidade dos pigmentos e da produção de citrinina em processos industriais, diversas ações podem ser tomadas para evitar ou minorar a produção de toxinas: o uso de cepas que não produzam citrinina; o controle da fonte de nitrogênio (fontes de nitrogênio orgânico favorecem a produção de pigmentos vermelhos e desfavorecem a produção de citrinina); o controle das condições de cultivo (aeração, pH, fermentação sólida ou submersa); a transformação de pigmentos laranja em complexos vermelhos, atóxicos, usando aminoácidos (Blanc *et al.*, 1995, 1995a; Juzlová *et al.*, 1996) e a extração em condições de baixa solubilidade de citrinina, o que pode ser feito controlando-se o pH, já que a citrinina apresenta caráter fortemente ácido (Merck, 1996).

2.6.1 Citrinina – propriedades e análise

A citrinina é um metabólito fúngico conhecido desde 1931, quando foi isolada de *Penicillium citrinum* e mais tarde da planta australiana *Crotalaria crispata*. Dez anos mais tarde foi caracterizada como um antibiótico e antibacteriano, e mais tarde testada para atividade contra bacteriófagos, sarcomas, protozoários, células animais e células de plantas superiores. A citrinina foi implicada na nefropatia porcina e foi encontrada como contaminante de milho, arroz, trigo e outros cereais, e em tomates podres. Assim, a citrinina é uma micotoxina potencialmente importante que pode ser ingerida por animais e pelo homem e poderia causar doenças. Em adição, efeitos fitotóxicos da citrinina foram reportados (Betina, 1984). A estrutura da citrinina é ilustrada a seguir (Figura 7):

Figura 7 – Estrutura da Citrinina



A citrinina tem caráter ácido pronunciado, é praticamente insolúvel em água, solúvel em álcool a quente, dioxano e solventes apolares. Devido às duplas ligações conjugadas, a citrinina absorve luz no comprimento de onda visível – a sua coloração varia de amarelo-limão em pH 4,6 a vermelho-cereja em pH 9,9 – e seus máximos de absorção encontram-se na faixa de ultravioleta: 250 e 331nm. Apresenta ponto de fusão 175°C e massa molar 250,25 g/mol (Merck, 1996).

Derivados da citrinina como decarboxicitrinina têm função metabólica desconhecida, mas diversos estudos em sistemas *in vivo* e *in vitro* indicam que a citrinina em si possui ação biológica pela inibição da síntese de colesterol e triglicerídeos, esta inibição sendo possivelmente causada por danos a sistemas de transporte e/ou interferências no metabolismo energético (Betina, 1984).

A produção da citrinina se dá de forma incidental em cereais contaminados por fungos, ou no apodrecimento de frutas. É uma das toxinas microbianas menos comuns como contaminante em safras do Ocidente, se comparada com aflatoxinas e ocratoxinas, embora apareça como metabólito secundário em algumas cepas de microorganismos comuns no Oriente. A produção *proposital* se dá em meios líquidos, em condição estática ou submersa, e em cereais por fermentação sólida. A ordem de produção em cultura estática, para *P. citrinum* é de até 1,75g/L em meio com 4% de sacarose e 2% de extrato de levedura, inoculados com suspensões de esporos de culturas com 10 a 14 dias. A produção máxima de citrinina se dá após 21 dias de fermentação. (Davis *et al.*, *op.cit.* em Betina, 1984).

A análise da estrutura da citrinina mostra que, em meio básico, a citrinina pode ter até dois grupos OH ionizados, o que aumenta a sua solubilidade em água, e em meio ácido deve possuir os grupos não ionizados (Figura 7). Assim, acidifica-se o meio a pH 4,5 e extrai-se com um solvente apolar. Esse solvente dissolve

também os lipídios e outros compostos apolares, de forma que uma purificação posterior é necessária. Essa purificação pode ser feita através de cromatografia preparativa em camada delgada, em que a toxina pode ser identificada pelo índice de retenção e pela fluorescência característica em luz UV (ultravioleta).

A análise de citrinina em culturas sólidas de fungos filamentosos pode ser feita pela extração direta com acetonitrila. O extrato, após filtração, é desengordurado duas vezes com isooctano. Após a adição de um volume igual de água e acidificação a pH 4,5 com ácido sulfúrico 50% (v/v), o extrato é particionado com CHCl_3 . A fase inferior é evaporada até a secura, redissolvida em metanol (Blanc *et al.*, 1995). A análise da solução pode ser feita por HPLC, mas a técnica inicial mais simples é a cromatografia em camada delgada (CCD).

Análise qualitativa: por CCD. A fase fixa compõe-se de placas de sílica gel 60 com espessura 0,2mm, impregnadas antes do uso com ácido oxálico (solução a 10% em metanol). Padrões e amostras da solução são colocados usando micropipetas com ponteiros descartáveis (de 5 μL). O desenvolvimento da amostra pode ser feito em uma dimensão usando clorofórmio-acetona (90:10, v/v) ou em duas dimensões (clorofórmio-acetona 90:10, depois tolueno-acetato de etila-ácido fórmico 60:30:30 v/v/v) (Blanc *et al.*, 1995a).

Análise quantitativa: por espectrofotometria ou HPLC. Após a identificação, por fluorescência em luz UV, da citrinina (comparada com um padrão na mesma placa ou pelo cálculo do tempo de retenção, de 0,6) a citrinina pode ser isolada da fase estacionária pelo cuidadoso corte da placa de alumínio e a ressuspensão da amostra em solvente adequado, por exemplo CHCl_3 , e a análise contra uma curva padrão de citrinina no mesmo solvente, para 250 ou 331nm (Blanc *et al.*, 1995a).

2.7 Métodos de análise de pigmentos

A análise da produção de pigmentos de *Monascus* é geralmente feita pela medida da absorbância do pigmento nas faixas próximas a 400, 470 e 500nm para pigmentos amarelos, alaranjados e vermelhos respectivamente (Johns e Stuart, 1991; Lin 1992). A relação absorbância a 500nm /absorbância a 400nm dá, supostamente, a relação entre pigmento vermelho e amarelo (Wong e Koehler, 1981). Alguns autores analisam pigmentos totais extracelulares e intracelulares

somando as absorbâncias de pigmentos extracelulares (é medida a absorbância do meio de cultivo líquido, filtrado) e intracelulares (é medida a absorbância de um extrato etanólico do micélio, filtrado) (Lin, 1991; Juzlová *et al.*, 1994). Quando se trata de fermentação sólida, o método usado tem de ser a extração por solvente para posterior leitura da absorbância. A quantidade de solvente usada é, geralmente, de 5mL de solvente para cada grama de material fermentado, e o tempo de extração varia de 1 a 12h, dependendo do autor. Como as amostras precisam em muitos casos ser diluídas para que se faça a leitura, os valores de absorbância não devem ser diretamente comparados e podem ser extrapolados para absorbância específica, levando em conta o fator de diluição da amostra (Chiu, 1993). A separação dos pigmentos pode ser feita usando CCD (cromatografia em camada delgada) com sílica gel 60 e desenvolvendo o cromatograma com clorofórmio:metanol:ácido acético 285:21:9 (Carels, 1977, op. cit em Martíňková, 1995). Os pigmentos podem também ser analisados por cromatografia líquida, usando uma coluna C₁₈ e um detector adequado. Note-se que a solubilidade do pigmento vermelho é mais elevada em uma solução aquosa contendo 60-70% de etanol (Carvalho *et al.*, 2002). Outros solventes podem ser usados (acetonitrila, dimetilsulfóxido, isopropanol), mas o único solvente comum que extrai pigmentos melhor que o etanol é o metanol – que, porém, não é recomendado para uso alimentício por ser tóxico.

O fato de que os pigmentos amarelos, alaranjados e vermelhos de *Monascus* são produzidos como uma mistura provavelmente afeta a análise por simples medida de absorbância. No entanto, a grande maioria dos pesquisadores de *Monascus* estimam a produção de pigmento por esse método, com produções de pigmento variando na faixa de centenas de unidades de absorbância/mL de meio de cultivo em fermentações submersas (por exemplo, 220 UA₅₁₀/mL, em condições ótimas, por Kim *et al.*, 2002, a milhares de unidades de absorbância/g de substrato seco, em FSS (por exemplo, 5430 UA₅₀₀/g matéria seca, por Lin e Demain [1992]). O melhor procedimento para a análise de pigmentos provavelmente é a cromatografia líquida, que permite separar e quantificar pigmentos individuais; usando este método, Hajjaj (2000) determinou que 1 unidade UA₄₈₀ correspondente a 15 mg/L de pigmento vermelho com M = 498 g/mol, e usou essa equivalência para conversão de medidas de absorbância de extratos em medidas de massa de pigmentos.

2.8 Uso e estabilidade de pigmentos de *Monascus*

Surpreendentemente, poucos trabalhos tratam da estabilidade de preparações à base de *Monascus*, considerando que diversas indústrias produzem esse pigmento. Alguma documentação pode ser obtida por consulta ao site www.allok.com. De acordo com Lin e Demain (1992), esses pigmentos são razoavelmente estáveis à autoclavagem e em uma ampla faixa de pH. De acordo com Fabre (1993), molhos ou patês coloridos com pigmentos vermelhos de *Monascus* apresentam uma cor residual de 92 a 98% após três meses a 4 °C, com boa aceitação sensorial. Os pigmentos são, no entanto, instáveis frente à luz (apenas 20% de cor residual após 50 dias) e calor (45% de cor residual após 2h a 100 °C). Esses pigmentos são mais estáveis em pH básico ou neutro (Fabre *et al.*, 1993; Lee e Chen, 2000).

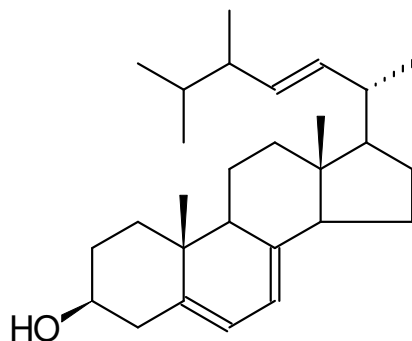
2.9 Método de análise de biomassa

Na fermentação em estado sólido geralmente não é possível fazer uma determinação direta da biomassa, devido à impossibilidade de separar eficientemente a biomassa da matriz do substrato, o que descarta os métodos gravimétricos. A biomassa pode ser medida de forma indireta pela determinação de componentes celulares como a glicosamina (presente na quitina, componente da parede celular de fungos), do ergosterol (presente na membrana celular), de proteínas ou de ácidos nucleicos (Pandey *et al.*, 2001). É possível ainda estimar a biomassa produzida através de um balanço de CO₂, levando em conta a composição da biomassa e estequiometria do processo. Nas análises por componentes celulares, é necessário levar em conta as possíveis interferências da composição do substrato: por exemplo, em fermentações usando quitina como parte do substrato, haverá provável interferência na análise de glicosamina; de forma semelhante, a análise de proteína sofre interferência das proteínas do substrato, especialmente quando não há adição de fontes de nitrogênio.

O ergosterol (Figura 8) é um componente celular que pode ser vantajosamente utilizado para a determinação indireta de biomassa fúngica, devido à sua facilidade de extração e análise. Esse componente é comumente quantificado para a determinação de biomassa fúngica em solos, porque é o esterol mais

importante na membrana celular de fungos e de algumas microalgas (Gong *et al.*, 2001), mas praticamente ausente em plantas e animais superiores (Mattila *et al.*, 2002). A análise de ergosterol foi proposta inicialmente para estimar a contaminação de cereais por fungos, mas logo foi adotada como um método para estimar a biomassa fúngica *viva* em solos, pressupondo que o ergosterol é um marcador lábil, que sofre rápida decomposição após a morte da célula.

Figura 8 - Estrutura do ergosterol



Outra aplicação para a dosagem de ergosterol é a determinação de biomassa e de esporos em superfícies de materiais – paredes, tijolos, etc. Em trabalhos recentes, determinou-se que o ergosterol *não é* lábil – persistindo em quantidades importantes dependendo das condições a que é submetido – o que exige cuidado quando se pretende usá-lo como marcador para células vivas (Lindblom *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2004). Isso, no entanto, reforça a utilidade em FMS, já que se garante a quantificação da biomassa total, com a permanência do ergosterol durante o processo.

A extração do ergosterol varia dependendo do grupo de pesquisa, mas de uma forma geral baseia-se no método de Seitz *et al.* (1979), que consiste em extrair os lipídios de uma amostra (de grãos) com metanol em refluxo, saponificar a amostra com solução de KOH a 70°C por 30 min e fazer uma nova extração com um solvente apolar, como o ciclohexano. Na tentativa de acelerar a extração, diversos autores usaram tratamentos térmicos ou mecânicos alternativos, com bons resultados – por exemplo, aquecendo o material em um forno de microondas (Montgomery *et al.*, 2000), situação em que a temperatura aumenta muito rapidamente e a recuperação de ergosterol é quase total. Outro método consiste na

agitação em vórtex da amostra com metanol e pérolas de vidro, seguida de centrifugação - sem saponificação ou extração posterior (Gong *et al.*, 2001), com recuperação de 100%; outro trabalho usa o método de Seitz, mas substituindo o aquecimento em refluxo pela sonicação da amostra, seguida de resfriamento e saponificação (Zhao *et al.*, 2004). Para amostras secas (liofilizadas), a extração com hexano pode ser feita antes da saponificação, como em Klamer e Bååth (2004).

A análise do ergosterol nos extratos é feita em geral por HPLC, com detector PDA (matriz de fotodiodos) a 282nm, que é o maior pico de absorbância para o ergosterol. A Tabela 4 mostra as condições de análise para algumas referências selecionadas:

Tabela 4 – Condições de análise de ergosterol em HPLC

Coluna	Fase móvel (V/V)	Vazão, mL/min	Tr, min	Referência
C ₁₈	Acetonitrila : metanol 98:2	2	-	Montgomery (2000)
C ₁₈	Metanol	1,0	15	Gong (2001)
C ₁₈ 4 µm	Metanol	1,5	7-8	Zhao (2004)
C ₁₈ 5 µm	Metanol	1	12,5 / 13,7	Lindblom (2004)
C ₁₈	Acetonitrila – metanol (gradiente)	2	12 a 13	Este trabalho

É ainda possível estimar a quantidade de ergosterol pela análise usando um espectrofotômetro, como fizeram Gutarowska e Zakowska (2002), embora isso inclua a absorbância por eventuais contaminantes, e exija, portanto, uma consistente extração prévia.

O teor de ergosterol varia bastante para diferentes espécies de fungos: na faixa de 3 a 5 mg/g biomassa seca em alguns basidiomicetos (Matilla *et al.*, 2002), 4 mg/g biomassa seca em alguns actinomicetos (Montgomery *et al.*, 2000) e em média 3,1 mg/g biomassa seca (numa faixa de 1 a 24 mg/g biomassa seca) para uma série de fungos presentes em composto, mais 2 basidiomicetos (Klamer e Bååth, 2004)

No caso específico de *Monascus* em FMS sobre arroz, a análise de biomassa via quantificação ergosterol é um método prático, já que a de nitrogênio protéico é inviável – pois o próprio substrato possui um teor de proteínas da ordem de 1%, que seria convertido parcialmente à biomassa e necessariamente quantificado indistintamente com a mesma. A análise de glicosamina, além de tediosa, é feita a 530 nm (Germano, 2000), podendo sofrer interferência dos pigmentos de *Monascus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – da UFPR.

3.1 Cepas e Manutenção

Um total de 4 cepas (linhagens) de *Monascus* foi utilizado neste trabalho: duas cepas fornecidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, NRRL 1991 (*Monascus. sp*) e NRRL 2897 (*M. purpureus*), uma cepa fornecida pela Fundação André Tosello, CCT 3802 (*M. purpureus*), e LPB 31, uma cepa isolada no LPB da UFPR através da técnica de repiques sucessivos em meio PDA, até obtenção de uma cultura pura, a partir de micélio de *Monascus* sobre arroz. A manutenção foi feita através de repiques periódicos (em intervalos de 3 a 4 meses) em PDA, com incubação a 30-32 °C durante 10 dias e refrigeração no período subsequente, até o repique seguinte.

3.2 Preparação de inóculos

Para as fermentações, dois tipos de inóculos foram usados, dependendo do experimento: 1) inóculo em meio líquido, para inoculação de fermentações em meio líquido (com volume superior a 500mL), fermentação em frascos para comparação de substratos, e fermentações em bandeja, e 2) suspensão de esporos/micélio extraídos de culturas em placa de Petri, para as fermentações em colunas, frascos, reator e culturas líquidas em erlenmeyer.

3.2.1 Inóculos em meio líquido

Foram obtidos pela inoculação com suspensão de esporos (obtidos de culturas em ágar PDA), de meio líquido com composição conforme Lin e Demain, 1991: para 1 litro de meio, são adicionados 40g de glicose, 3g de NH_4NO_3 , 6g de K_2HPO_4 , 6g de KH_2PO_4 , 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g de KCl , 10mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH ajustado com NaOH ou HCl a 5,5-

6,3; após inoculação, o meio é incubado por 3 dias a 100rpm e 32°C, em shaker, e utilizado para inoculação na proporção de 5% em relação à massa ou volume do meio de cultivo a inocular, imediatamente antes do período de incubação, por transferência com pipetas (para meios sólidos) ou bomba peristáltica (para fermentador de bancada).

3.2.2 Suspensões de esporos

Estes inóculos foram preparados imediatamente antes do seu uso, e obtidos a partir das culturas-estoque por inoculação, com alça metálica, sobre ágar PDA estéril, em placas de Petri, e incubadas por 8 a 10 dias. Após a incubação, foi feita a suspensão de esporos através da adição de 5 mL de Tween 80 a 0,1% sobre as placas, com o auxílio de uma alça de Drigalski. As suspensões de esporos foram padronizadas pela adição de água, para 0,5 a 1.10^6 esporos/mL, contando como “esporos” os próprios esporos e também fragmentos miceliais intactos. A contagem foi feita por microscopia, utilizando-se uma câmara de Neubauer (Leica DMLS). Os inóculos foram transferidos aos frascos ou colunas em que foram feitas as fermentações, usando pipetas, com posterior homogeneização do meio. A taxa de inoculação utilizada foi equivalente a 5% do volume (em fermentação líquida em erlenmeyer) ou da massa (em FSS) do material a fermentar. Por exemplo, em FSS de 20g de arroz em frascos foi utilizado $20 \times 5\% = 1\text{mL}$ de suspensão de esporos.

3.3 Comparação de cepas

3.3.1 Determinação de crescimento radial

O crescimento radial das linhagens foi medido inoculando-se placas com meio PDA com as respectivas linhagens, em um único ponto no centro de cada placa, em duplicata (8 placas). As placas foram incubadas a 30°C, por 12 dias. A medida das colônias foi feita com régua, a partir do centro da placa, ao longo de 2 eixos perpendiculares (4 medidas por placa), a intervalos de cerca de 24h. Os valores obtidos foram usados para compor valores médios (média aritmética) de comprimento x tempo de incubação.

3.3.2 Comparação de cepas quanto à produção de pigmentos

A comparação foi feita incubando 10g de meio (arroz com 56% de umidade ou bagaço de mandioca com 70% de umidade) a 32°C em frascos de vidro de 600mL, após inoculação com suspensões de esporos das diferentes cepas, por 8 dias (arroz) e 10 dias (bagaço de mandioca). Após a incubação, os fermentados foram secos, e determinou-se o teor de pigmentos (método na página 39) e de citrinina (método na página 40).

3.4 Comparação de métodos de extração

3.4.1 Extrações estática, agitada, com Soxhlet, com diferentes solventes

Como trata-se de desenvolvimento de método, os métodos utilizados encontram-se na seção Resultados e Discussão (página 48). Os solventes utilizados foram dimetil sulfóxido (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$); n-hexano, éter etílico, álcool etílico, acetonitrila, metanol, clorofórmio e isopropanol. Todos os solventes utilizados eram PA. A água utilizada para extrações era deionizada. Quando necessário, o pH da água foi ajustado com HCl ou NaOH.

3.5 Substratos utilizados

Além dos meios de cultivo utilizados para inóculos (vide seção anterior), foram usados os seguintes meios, dependendo do objetivo do experimento:

3.5.1 FSS em arroz, em coluna, frasco ou bandeja

Arroz cateto integral umedecido com água deionizada, até 56% de umidade, com ajuste do pH para 6,5 com adição de HCl ou NaOH, e posterior autoclavagem a 121°C por 15 minutos. O ciclo da autoclave garante o cozimento do arroz e a gelatinização do amido, mas para melhores resultados é necessário permitir que o arroz absorva parte da água antes da esterilização, deixando-o em repouso por 2 a 4 horas. O meio de cultivo assim preparado deve ser usado logo depois do resfriamento, para evitar aglutinação excessiva. O método tradicional de preparo de inóculo consiste em deixar o arroz de molho em água, por 24h, e posteriormente

cozinhá-lo com vapor (Palo *et al*, 1960; Wong e Koehler, 1981); esse método, embora eficiente, é inconveniente para os ensaios com umidade controlada, devido à impossibilidade de controlar a absorção de vapor pelo arroz.

3.5.2 FSS em bagaço de mandioca, em coluna, frasco ou bandeja

Bagaço de mandioca com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm, adicionado de água deionizada até 70% de umidade, com ajuste de pH para 6,5 com adição de HCl ou NaOH e posterior esterilização em autoclave por 15 min a 121 °C.

3.5.3 FSS de diferentes substratos potenciais, em frascos

Foram usados como substratos quirera de milho, quirera de arroz, trigo para quibe, soja moída, farelo de soja, proteína texturizada de soja, tapioca, mandioca crua, bagaço de mandioca, farinha d'água e batata seca. Esses substratos foram moídos e classificados por peneiramento, utilizando-se a fração de granulometria entre 0,8 e 2,0mm. Os meios foram preparados pela mistura de 10g de substrato com água suficiente para completar 56% de umidade, ajustando o pH para 6,5 quando necessário e prosseguindo com a esterilização a 121 °C por 15 min. Os experimentos foram feitos em triplicata, inoculados com 5% v/m de uma cultura ativa em meio líquido (Lin e Demain, 1991) e incubados a 30-32°C por 8 dias.

3.6 Otimização das condições de cultivo em bagaço de mandioca

Para os planejamentos experimentais descritos na seção Resultados e Discussão (item 4.5.3) foram utilizados meios preparados com bagaço de mandioca de granulometria 0,8-2,0 mm, adicionados de levedura seca (fermento biológico Burgemann) e proteína texturizada de soja, micronizada com um moinho de lâminas no LPB. Os componentes dos meios foram adicionados a frascos de vidro de 600mL, autoclavados e inoculados com suspensões de esporos, e incubados por 10 dias a 32 °C. A análise de pigmentos foi feita como descrito no método da página 39.

3.7 Ensaios de estabilidade de pigmentos

Os pigmentos usados para ensaios de estabilidade foram extraídos de biomassa pura, obtida de uma fermentação líquida. O inóculo para esta fermentação foi uma cultura ativa de 3 dias, em meio líquido (conforme descrito na página 33). A fermentação foi feita em um fermentador Bio-Flo de 15L, com 12L de meio líquido, com um aeração de 10 NLPM (litros normais por minuto, isto é, a aeração equivalente a 10 litros de ar a 0°C e 1atm, por minuto), controlado através de um rotâmetro com válvula. A agitação foi de 100 rpm, a 32°C, por 10 dias. O meio utilizado foi o de Lin e Demain (1991).

3.7.1 Isolamento da biomassa

Após o cultivo, o meio de fermentação foi filtrado através de um filtro de tecido, e a biomassa lavada com água deionizada, drenada e congelada a -20°C. Essa biomassa foi posteriormente utilizada para os ensaios de estabilidade de pigmentos.

3.7.2 Preparação de extratos

Uma amostra de 5g de biomassa drenada e congelada foi misturada com 25 mL de etanol 95%. Após 1h de extração com agitação periódica, a mistura foi filtrada através de uma membrana de 0,47µm, e o filtrado foi usado como extrato bruto de pigmentos.

3.7.3 Soluções de pigmentos

Um volume de 5mL do extrato alcoólico bruto foi diluído com água suficiente para completar 500g. A partir dessa solução, foram preparadas outras soluções com a mesma concentração, mas com pH ajustado a valores diversos – 4,1; 4,7; 6,0; 7,3 e 7,9 – pela adição de soluções de NaOH ou HCl. A diluição causada pela adição de ácido ou base foi estimada como sendo da ordem de 0,5% em peso. Uma solução alcoólica foi preparada de forma similar, diluindo 1mL de extrato alcoólico bruto em álcool 95%, até um volume final de 100mL.

3.7.4 Análises de estabilidade

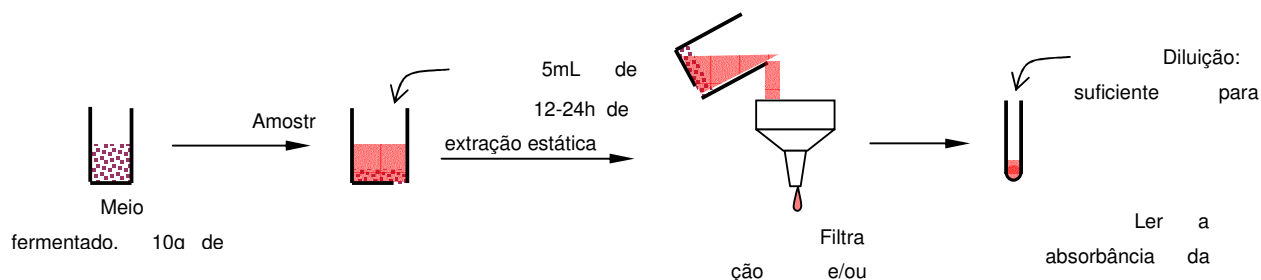
As soluções aquosas e alcoólicas foram armazenadas em tubos de ensaio de mesmo tamanho, cor e espessura, com tampa, e incubadas a diferentes temperaturas por várias horas. A intensidade de cor foi lida como absorbância a 500nm, diretamente para cada tubo, contra água como branco. Com esse procedimento, evitou-se a alteração da absorbância dos extratos por transferências sucessivas para a cubeta de leitura do espectrofotômetro. Os resultados foram normalizados dividindo a absorbância obtida para cada tubo ao longo da incubação, pela absorbância inicial nesse mesmo tubo.

3.8 Extração de pigmentos e análise da absorbância

Os pigmentos de *Monascus* foram extraídos de meios fermentados por FSS ou de biomassa separada por filtração de fermentados de FL. O solvente utilizado foi etanol a 95%, exceto para experimentos de comparação de solventes. A proporção de etanol:fermentado utilizada foi de 5mL etanol para cada grama de fermentado seco, ou maior (quando se desejava realizar uma diluição do pigmento no mesmo passo da extração), exceto para ensaios de proporção solvente:substrato na extração. O tempo de extração foi de 12 a 24h, em extração estática.

A produção de pigmentos nos experimentos foi estimada através da leitura da absorbância a 500nm (expressa como UA, unidades de absorbância). Os valores obtidos para ensaios em condições idênticas podem ser comparados diretamente, apenas corrigindo o valor de absorbância para a diluição. Se for necessário comparar ensaios diferentes (inclusive quando varia o inóculo de uma duplicata de experimento), os resultados devem ser transformados em uma absorbância específica, isto é, corrigidos pela diluição e pela *quantidade de fermentado* do qual se extraiu o pigmento. A Figura 9 ilustra um exemplo em que 1g de meio fermentado é extraído, filtrado, diluído e analisado.

Figura 9 – Procedimento de extração e análise de pigmentos de *Monascus* para determinação da produção de pigmentos vermelhos



A leitura de absorvância dos extratos dos diversos ensaios foi feita no comprimento de onda de 500 nm, correspondendo a um máximo de absorvância para os pigmentos vermelhos (Johns e Stuart, 1991; Lin e Demain 1992), após filtração com membrana (0,47µm) ou centrifugação por 15 min a 10.000g. Quando necessário, os extratos foram diluídos com etanol. A absorvância obtida foi corrigida contra branco (etanol 95%) e multiplicada pela diluição, pelo volume de solvente usado na extração e dividida pela massa seca inicial de substrato, para fornecer o que chamamos de absorvância específica. Por exemplo, para uma extração de 10g de fermentado seco, extraído com 50mL de etanol 95%, diluído a 1:20 e com a absorvância da amostra sendo 0,354:

$$\text{ABS específica} = 0,354 \times 20 \times 50 / 10 = 35,4 \text{ UA/g}$$

sendo o resultado dado em UA/g, unidades de absorvância por massa seca de substrato. Esse resultado é comparado diretamente para diferentes experimentos, sendo considerado como proporcional à quantidade de pigmentos vermelhos produzidos na fermentação (Johns e Stuart, 1991; Lin e Demain, 1992; Chiu e Poon, 1993). Embora a maioria dos pesquisadores de *Monascus* trabalhe com a produção de pigmentos expressa como UA/frasco ou UA/g fermentado seco, alguns pesquisadores – especialmente os que utilizam fermentação líquida – convertem os valores de UA em massa de pigmento. Hajjaj *et al.* (2000) consideram que $1\text{UA}_{480} \sim 15\text{mg/L}$. A partir dessa consideração, pode-se concluir que a absorvância específica do pigmento puro é de 66,7kUA/g pigmento. Usando esse fator de conversão para estimar a massa de pigmentos em FSS, é possível comparar a produção obtida em experimentos usando FSS (onde a produção de

pigmentos é geralmente expressa em função da absorbância) com resultados de fermentação submersa (onde a produção é expressa como concentração em mg/L). A absorbância relativa é, dentro de um conjunto de valores de absorbância específica, a porcentagem em relação ao valor mais alto.

3.8.1 Extração de pigmentos na comparação de substratos

Os meios fermentados foram secos a 55°C por 24h, seguindo-se extração estática com etanol a 95% por 12h, e finalmente centrifugação dos extratos a 10000g por 15 minutos para precipitar partículas. Quando necessário, as amostras foram diluídas para permitir leitura no espectrofotômetro.

3.9 Extração e análise da citrinina

3.9.1 Extração

Para verificar a produção de citrinina nas culturas de *Monascus*, é necessário efetuar uma extração; o método consiste em efetuar uma extração aquosa a partir das culturas sólidas, deixando-as por 1h em contato com água, sob agitação a 100 rpm, na proporção de 10 mL de água/ g de substrato seco original. O extrato é filtrado e extraído duas vezes com 10 mL de n-butanol saturado com água. A fase orgânica é, em seguida, seca com Na₂SO₄ anidro, e a solução é concentrada por secagem a vácuo (a uma temperatura máxima de 45°C). O resíduo seco é redissolvido em 50 mL de água deionizada, que é acidificada até pH 2 (medido com papel de pH universal), usando HCl 3M. A solução é extraída 2 vezes com acetato de etila (2x10mL), seca com Na₂SO₄ e evaporada sob vácuo reduzido, e finalmente ressuspensa em metanol (500µL/g de substrato seco original) para análise cromatográfica.

3.9.2 Cromatografia preparativa de citrinina

Para separar melhor a fração correspondente à citrinina no extrato em análise, procedeu-se à aplicação de uma alíquota de 200µL de solução metanólica em placas de sílica gel 60 (Merck & Co, NJ – EUA) em paralelo com um alíquota de

50 µL de citrinina 2000ppm em metanol. A corrida foi feita com uma mistura água – metanol 1:1 (v/v) acidificada com HCl (pH 3). A região da placa contendo a fração correspondente à citrinina foi recortada, ressuspensa em metanol (2mL), filtrada, evaporada até secagem, ressuspensa em 20µL de metanol e injetada como amostra no HPLC.

3.9.3 Análise de citrinina

Após a extração, o resíduo ressuspensa que pode conter citrinina é analisado por cromatografia em HPLC usando uma coluna C₁₈ com um gradiente de concentração de H₂O/MeOH à temperatura ambiente, com vazão de 0,8mL/min, com a leitura sendo feita a 260 nm. (Blanc *et al.*, 1995a). O padrão de citrinina usado para comparação foi citrinina PA, Sigma.

3.10 Análise de biomassa em FSS

Foi utilizado 1g de amostra de cada coluna sob análise (as mesmas amostras usadas na respirometria).

3.10.1 Preparo de padrão de biomassa

Foram preparados 100 mL de meio líquido (Lin e Demain, 1991), que foram em seguida autoclavados e inoculados com um pedaço de micélio em ágar (cerca de 0,5 cm²), incubado sob agitação (120 rpm) por um dia e de forma estática por mais 7 dias, a 32 °C.

3.10.2 Extração da biomassa

A biomassa obtida na fermentação anterior foi filtrada em papel e seca a 40 °C em dessecador com sílica gel como adsorvente, por 12 horas.

3.10.3 Extração do ergosterol

Método adaptado de Seitz (1979): 0,5 g das amostras de fermentado e 0,4 g de biomassa seca foram colocados em frascos de vidro, aos quais adicionou-se 2mL

de etanol P.A. e 1 mL de solução de NaOH 2M. Os frascos foram agitados, tampados e incubados a 70°C por 30 min., com agitação periódica. Após a incubação, adicionou-se a cada frasco 2mL de ácido clorídrico 1M, agitou-se, adicionou-se 1mL de KHCO₃ 1M e 2 mL de n-hexano. A mistura foi agitada, transferida para um tubo de ensaio e centrifugada para separar as fases leve e pesada. A fase leve (n-hexano) foi recolhida, e procedeu-se a nova extração com mais 2mL de n-hexano, e uma última extração com 1mL de n-hexano. O extrato na fase orgânica foi evaporado a vácuo (200mmHg) a 35°C, ressuspendido em 200mL de n-hexano e filtrado em membrana de PVDF.

3.10.4 *Análise do ergosterol*

A análise dos extratos foi feita em um HPLC Varian ProStar, com coluna C₁₈ e detetor PDA (matriz de fotodiodos) regulado a 282 nm. As condições de eluição do analito foram desenvolvidas a partir de Montgomery *et al.*, (2000); Gong *et al.*, (2001); Zhao *et al.*, (2004); e Lindblom *et al.*, (2004) e ajustadas para o equipamento usado no LPB.

Utilizou-se 10 µL de amostra. A fase móvel utilizada foi metanol puro (de 0 a 3 min), acetonitrila pura de 3 a 10 minutos, e metanol puro de 10 a 15 minutos com vazão de 2mL/min, para eluir outros componentes presentes na amostra. O tempo de retenção obtido foi de 3,35 minutos. Como amostra padrão foi utilizada uma solução de ergosterol PA a 10000µg/mL, com diluições a 5000 e 1000 µg/mL. Como amostra para a linha base utilizou-se 10 mL de hexano puro.

3.11 **Análise respirométrica**

3.11.1 *Respirometria em colunas*

Com o objetivo de determinar parâmetros cinéticos de crescimento e produção de pigmentos por *Monascus* LPB 31, foi utilizado um sistema de fermentação em colunas, com banho de temperatura controlado a 32°C. Foram utilizadas 10 colunas, contendo 60g de arroz com 53% de umidade inicial + 3 mL de inóculo líquido com 2,5.10⁶ esporos/mL (aumentando portanto a umidade para cerca de 56%). O meio de cultivo inoculado foi pesado dentro de uma câmara de fluxo

laminar. As colunas foram fechadas em ambas as extremidades com filtros de algodão, e ligadas a umidificadores para saturar o ar com umidade. A aeração utilizada foi de $1\text{NmL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato para cada coluna, medido usando-se um rotâmetro; a temperatura foi controlada em 32°C . O CO_2 produzido e o O_2 consumido pelas culturas foram medidos através de um sistema de cromatografia gasosa (Shimadzu GC-8A, Shimadzu Co., Japão) acoplado a um programa de controle do cromatógrafo, integração e registro dos resultados (Chroma Biosystèmes, Ltd., França). A coluna utilizada no cromatógrafo foi uma Porapak 80/100 a 60°C , com 2m de comprimento, com hélio como gás de arraste e detector de condutividade térmica. À medida que os meios foram fermentando, as colunas foram retiradas uma a uma, a intervalos de cerca de 24h, e congeladas a -20°C em freezer para posterior análise. Antes das extrações, os fermentados das colunas foram secos a vácuo (10mmHg) a 45°C por 24 horas, para posterior análise dos pigmentos e da biomassa (via análise do ergosterol).

3.11.2 *Respirometria em reator*

Uma segunda análise respirométrica foi feita usando um reator desenvolvido no LPB, com 2400g de arroz com 56% de umidade, fermentado com uma temperatura controlada em 32°C . Amostras foram retiradas diariamente do reator e congeladas a -20°C em freezer, para posterior secagem a vácuo (10mmHg) a 45°C por 24 horas. Para este experimento foi feito o mesmo acompanhamento e análises feitas para o sistema em coluna, exceto a análise de biomassa.

3.12 **Cálculos - Regressão, ajuste de curvas e parâmetros cinéticos**

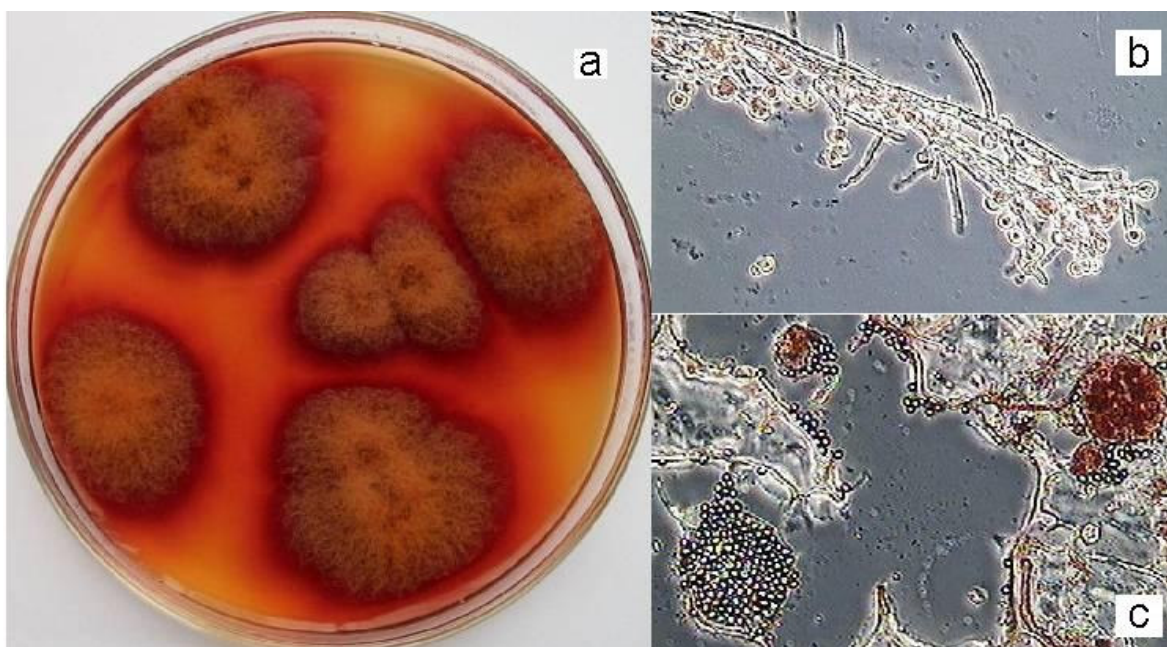
Quatro programas de computador foram utilizados para a determinação dos parâmetros cinéticos, superfícies de resposta, etc. Para os gráficos de planejamento experimental YEA-PTS- H_2O foi utilizado o software Statistica 4.3 (STATSOFT). Para os ajustes sigmoidais de biomassa e pigmentos foi utilizado o software Origin Pro 6.1 (OriginLab); para ajustes de regressão linear e demais gráficos foi utilizado o software Excel 2002 (Microsoft). Para determinação de parâmetros cinéticos, de acordo com Pandey *et al.* (2001), foi utilizado o programa FERSOL (Rodriguez-León, 1988).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e caracterização do microorganismo.

A linhagem LPB 31 foi isolada a partir de arroz contaminado com fungos vermelhos. Porções do micélio e esporos foram retirados da amostra com uma alça metálica, e inoculadas em um tubo com ágar PDA inclinado, com incubação a 28°C. Após o crescimento, uma alçada do micélio foi repicada em ágar PDA, que foi incubado novamente. O processo foi repetido sucessivamente até a obtenção de culturas de aspecto homogêneo, consideradas como culturas puras. A observação dessas culturas revela que o microorganismo isolado apresenta as características típicas de culturas de *Monascus*, isto é: colônias planas, com algum desenvolvimento aéreo, micélio inicialmente branco, ganhando pigmentação ao longo do envelhecimento (do centro para a borda), pigmentação característica pardo-avermelhada, com difusão de pigmentos pelo ágar. A Figura 10a mostra uma placa de ágar PDA com algumas colônias bem desenvolvidas. Nota-se um halo de pigmentação, bem difundido por quase toda a placa, e o aspecto floculento do micélio aéreo.

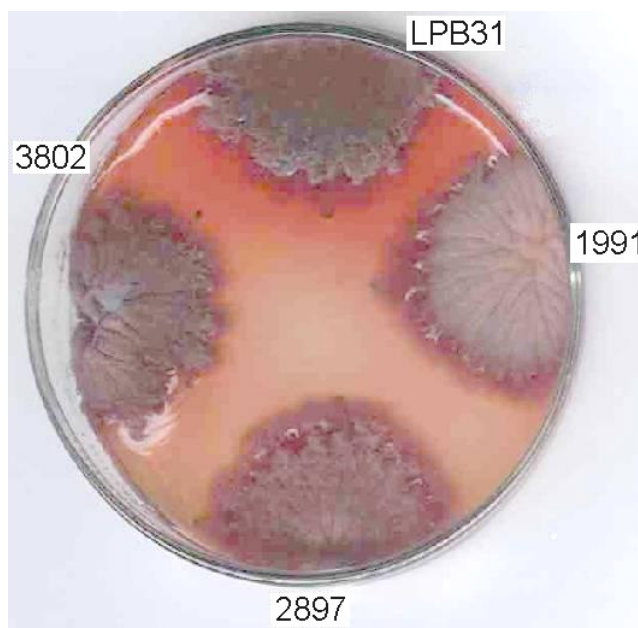
Figura 10 – (a) aspecto macroscópico e (b,c) microscópico, com aumento de 400 vezes, da cepa LPB 31 após 7 dias, em PDA a 30°C



O exame microscópico mostra um micélio com pigmentação pardo-avermelhada, cleistotécios com paredes finas e ascósporos hialinos de forma ovalada. A Figura 10b mostra uma porção isolada do micélio aéreo, com a formação de aleurioconídias terminais, piriformes e isoladas. A Figura 10c mostra um cleistotécio intacto e outro rompido, com a liberação de esporos.

O aspecto das culturas da linhagem isolada em placa também remete a outras espécies de *Monascus*, inclusive pela produção de pigmentos de coloração típica. A Figura 11 mostra as 4 linhagens de *Monascus* usadas neste trabalho, incubadas a 30-32 °C.

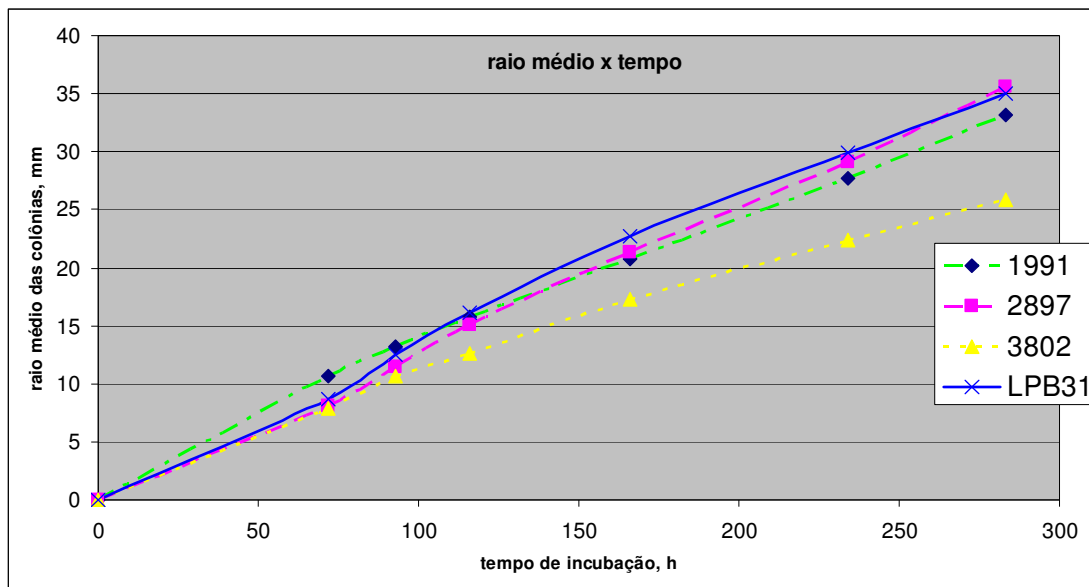
Figura 11 – Diferentes linhagens de *Monascus* em PDA, incubadas por 8 dias a 30-32 °C



4.2 Comparação de cepas

As quatro cepas de *Monascus* utilizadas foram comparadas quanto à velocidade de crescimento em PDA, medido através do crescimento radial (Figura 12) e pela produção de pigmentos vermelhos em arroz e em bagaço de mandioca, após 7 e 11 dias de fermentação, respectivamente.

Figura 12 – raio médio das colônias (mm) x tempo de incubação (h) para as linhagens comparadas



A análise do gráfico mostra que as linhagens 1991, 2897 e LPB 31 desenvolvem-se de forma comparável, com tamanho de colônia um pouco maior para LPB 31, enquanto a linhagem CCT 3802 apresenta colônias cerca de 30% menores.

Os resultados da Figura 12 mostram que a cepa isolada, LPB 31, apresenta velocidade média de crescimento similar à das cepas NRRL 2897 e NRRL 1991, e superior à linhagem CCT 3802.

Tabela 5 – Crescimento, produção de pigmentos e produção de citrinina pelas linhagens testadas, após 7 dias de incubação (arroz) e 11 dias (bagaço de mandioca).

Cepa	Crescimento radial médio (mm/dia)	Coeficiente de regressão para o crescimento radial, R^2	Produção de pigmento (UA / g de produto seco)		Produção de citrinina em arroz µg/g produto seco
			Arroz, 56% umidade	BM, 70% umidade	
NRRL 1991	2,9	0,983	16,9	2,4	25
NRRL 2897	3,0	0,998	14,1	13,0	22
CCT3802	2,3	0,980	15,5	2,1	20
LPB 31	3,1	0,994	89,3	20,0	18

A Tabela 5 indica ainda que a cepa isolada apresenta também produção de pigmento expressivamente superior às outras testadas, em bagaço de mandioca e

especialmente em arroz (o bagaço de mandioca foi utilizado por ser um substrato tradicional usado em FSS no LPB, enquanto o arroz é o substrato tradicional para a produção de pigmentos de *Monascus*). Comparando as características das linhagens testadas com outras linhagens avaliadas por Miyashira *et al.* (2003), também em FSS de arroz, verifica-se que a linhagem isolada, LPB 31, é superior às outras linhagens de *Monascus* testadas, e apresenta nessas condições pigmentação apenas 13% inferior a um produto comercial (Tabela 6):

Tabela 6 – Comparação de linhagens diversas quanto à produção relativa de pigmentos, a produtividade e a produção de citrinina, para fermentação em arroz.

Linhagem	Absorbância relativa (500nm)	Produtividade dia ⁻¹	Citrinina µg/g produto
CCT 3802	0,15 ^a	0,021	20
ATCC 6405	0,47 ^a	0,047	23
ATCC 16365	0,47 ^a	0,067	83
UFPE 3196	0,14 ^a	0,01	29
Produto comercial	1,00 ^a	0,07	31
NRRL 1991	0,16	0,023	25
NRRL 2897	0,14	0,020	22
CCT 3802	0,15	0,021	20
LPB 31	0,87	0,124	18

a – valores extraídos de Miyashira, 2003

A absorbância relativa é a absorbância obtida para cada cepa, nas mesmas condições, dividida pelo maior valor (o do produto comercial). A produtividade foi calculada dividindo-se a absorbância relativa pelo tempo de fermentação. Verifica-se pela análise da Tabela 6 que a melhor linhagem testada é o isolado LPB 31, tanto em termos de produção relativa – inferior apenas ao produto comercial, em *ca* 13% – quanto em produtividade de pigmento, superior aos demais, e produção de citrinina, a *menor* entre todas. Isso mostra que um produto fabricado a partir dessa linhagem pode ser similar ao comercial em termos de cor, e melhor em termos de toxicidade, apresentando cerca de 40% menos citrinina que o produto comercial. Assim, a cepa LPB 31 foi selecionada para os demais ensaios, visando o desenvolvimento de um bioprocessos para a produção desses pigmentos.

4.3 Otimização das condições de extração de pigmentos

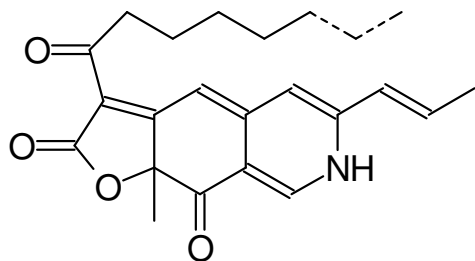
Todos os ensaios de comparação de substratos, formulação de meios de cultivo, cinética de produção de pigmentos e a própria separação e formulação de um produto baseado em *Monascus* dependem da extração eficiente dos pigmentos. Os experimentos a seguir foram realizados para definir as melhores condições de extração de pigmentos de *Monascus*, a partir de fermentados obtidos em frascos de vidro como descrito em Material e métodos.

4.3.1 Extrações estáticas ou agitadas

A extração de pigmentos de *Monascus* pode ser feita de forma estática com agitação ocasional, por período de 1h ou mais, ou estática por 12 horas, (Chiu e Poon, 1993) com resultados equivalentes. Uma forma de aumentar a eficiência da extração é usar um extrator de Soxhlet (realizando extrações sucessivas, à exaustão) o que apresenta um grau de extração superior em cerca de 20% às extrações estáticas, mas com aparato mais complexo (dados não publicados). Os ensaios a seguir foram feitos com fermentados diversos, mas sempre em condições idênticas dentro de um mesmo ensaio, com tempo de extração de 24h, para garantir a eficiência na extração.

4.3.2 Extração usando diferentes solventes

Analisando as estruturas dos pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus*, pode-se concluir que as moléculas são pouco polares, devido aos três grupos carbonila presentes na molécula e ao grupo amino (Figura 13); como existe uma cadeia apolar (de 7 carbonos na monascorubramina e 5 carbonos na rubropunctamina), é difícil prever a solubilidade desses pigmentos pela mera inspeção da estrutura.

Figura 13 – Estrutura dos pigmentos vermelhos de *Monascus*

A solubilidade dos pigmentos vermelhos em diferentes solventes foi testada usando bagaço de mandioca fermentado, previamente seco (para evitar a interferência de umidade) para diferentes quantidades e tipos de solventes, de acordo com o descrito na seção Material e Métodos. Os resultados dos experimentos são ilustrados a seguir (Tabela 7). Os solventes estão listados em ordem decrescente de índice de polaridade de Snyder.

Tabela 7 – Absorbância relativa de pigmentos vermelhos extraídos com diferentes solventes, a partir de 1g de substrato seco fermentado

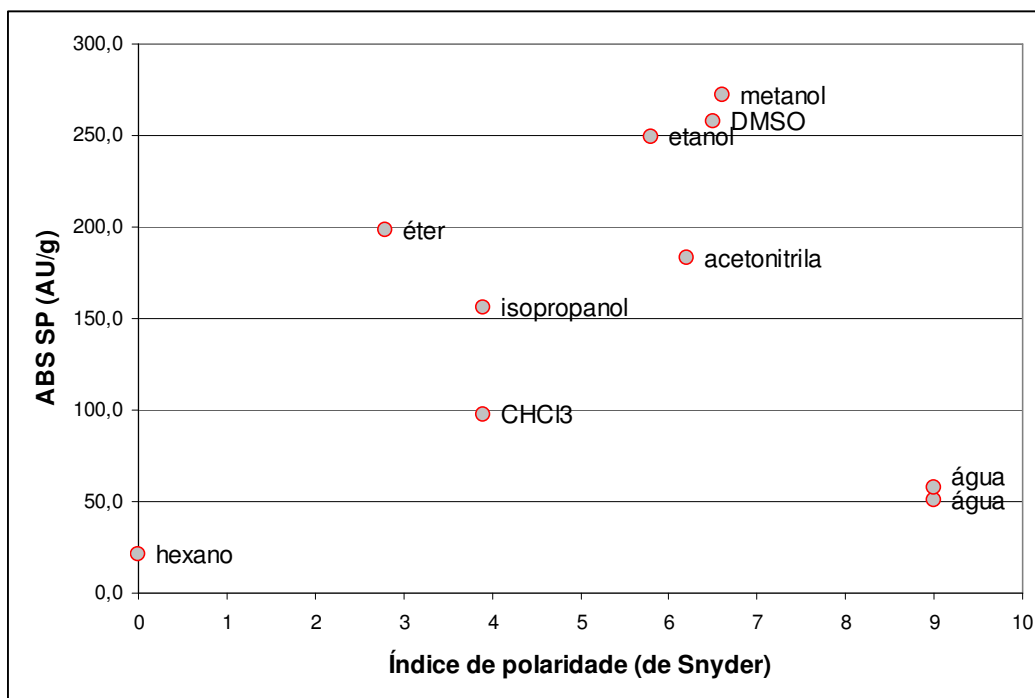
Solvente	Absorbância relativa (% do máximo extraído)
Água, pH 1	2,2
Água, pH 3	6,2
Água, pH 7	5,6
Água, pH 11	3,8
Água, pH 12,3	19,7
DMSO	100
Acetonitrila	70,8
Etanol 95%	96,6
Éter etílico	76,7
Hexano	8,3

Os resultados indicam que a água não é um solvente adequado para a extração de pigmentos de *Monascus* produzidos em FSS. A mudança na cor em pH 12,3 indicada na Tabela 7, pode ser devida a mudanças em componentes do substrato ou na estrutura dos pigmentos, o que merece investigação futura. Outra possibilidade é que em pH 12,3 ocorra saponificação dos lipídios da membrana celular dos microorganismos, com maior dispersão dos pigmentos intracelulares. Se

for esse o caso, significa que os pigmentos são melhor extraídos por álcoois não só pela sua solubilidade intrínseca, melhor que a da água (Hajjaj, 2000 postula que os pigmentos de *Monascus* não são hidrossolúveis), mas também pelo efeito de permeação da membrana celular.

Como parece haver um grau de correlação entre o índice de polaridade dos solventes e a capacidade de solubilizar pigmentos de *Monascus*, mais algumas extrações foram feitas, usando também como solventes clorofórmio, isopropanol e metanol. A Figura 14 mostra a quantidade de pigmentos extraídos, na forma de absorbância específica, em função do índice de polaridade dos solventes. Aparentemente pode haver correlação entre as duas grandezas, verificando-se um máximo para a faixa próxima a $IP = 6,5 \pm 1$, e uma menor eficiência na extração para IP acima e abaixo dessa faixa.

Figura 14 – Quantidade de pigmentos extraídos (como ABS SP) em função do índice de polaridade dos solventes.



Entre os solventes orgânicos, o dimetil sulfóxido (DMSO) e o etanol tiveram os melhores resultados, quase equivalentes entre si, perdendo apenas para o metanol. Apesar do melhor desempenho, o metanol é um solvente tóxico, cujo uso

não é liberado para preparação de pigmentos para alimentos (ANVISA, 2004). O dimetil sulfóxido, embora pouco tóxico, é menos volátil que os álcoois, mais caro e também não liberado para uso em alimentos. Como o etanol é mais barato, é volátil, atóxico e de uso liberado para preparação de formulações de pigmentos (ANVISA, 2004), foi usado para os experimentos subseqüentes. Esses resultados estão em concordância com experimentos realizados por Lin (1992) com etanol e metanol.

4.3.3 Quantidade de solvente

As condições típicas de extração usadas por diversos autores são: extração com etanol 95%, em proporção 1:5 g substrato fermentado:mL de solvente. Com o objetivo de determinar se há saturação do solvente com os pigmentos nessas condições de extração, e em que grau, foram feitas extrações agitadas usando diferentes quantidades de solvente (etanol 95%). Os resultados obtidos são apresentados a seguir (Tabela 8)

Tabela 8 – Influência da quantidade de solvente (etanol 95%) usada na extração de pigmentos vermelhos de *Monascus*

Massa de fermentado (BM) (g)	Massa de solvente (g)	Razão solvente / substrato	Pigmentos (UA ₅₀₀ /g substrato seco)	UA extraídas por 1g de solvente (UA/g)
5	15	3	16,2	5,40
5	20	4	15,5	3,87
5	28	5,6	15,0	2,65
10	90	9	16,6	1,85
5	95	19	16,0	0,84
5	95	19	18,1	0,95
4	96	24	16,6	0,69
3	97	32,3	16,3	0,50
2	98	49	16,0	0,33
2	98	49	17,5	0,36
1	99	99	15,2	0,15
0,8	99,2	124	15,3	0,12
0,4	99,6	249	15,8	0,06
0,2	99,8	499	18,3	0,04

Pode-se concluir, analisando a Tabela 8, que há pouca diferença na absorbância específica usando grandes quantidades de solvente. Isso mostra que o solvente extraiu, dentro da faixa de proporções solvente:fermentado testada,

praticamente todo o pigmento que poderia ser dissolvido – de forma que a absorbância é proporcional não à quantidade de solvente, mas à quantidade de substrato usado para a extração. Esses resultados indicam que, embora a relação 5:1, freqüentemente usada, seja adequada, menos solvente poderia ser utilizado. Uma proporção 3:1 de solvente:substrato fermentado seco apresenta boa eficiência na extração. Isso significa menos solvente a utilizar durante o processamento industrial, além de menor quantidade de solvente a extrair em uma eventual etapa de evaporação. A maior eficiência poderia eventualmente implicar em menor tempo de extração (embora isso não tenha sido especificamente testado).

4.3.4 Eficiência na extração

Extrações estáticas usando etanol 95% por 24h não mostraram efeito significativo da temperatura, em uma faixa de cerca de 60°C, com valores de teste de 2, 22, 32, 39 e 58°C. Assim sendo, as extrações feitas nas etapas subseqüentes deste trabalho foram feitas sem controle de temperatura.

Misturas de solventes – etanol/água. Com o objetivo de verificar se álcool anidro, etanol 70%, etanol 95% ou outra concentração podem ser mais ou menos eficientes na extração de pigmentos, um ensaio foi realizado com 1g de fermentado sendo extraído por misturas de água-etanol com diferentes proporções, em extração estática (Tabela 9):

Tabela 9 – efeito da composição do solvente (misturas de etanol e água) na eficiência na extração (como absorbância relativa) de pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus*

Etanol (g)	água (g)	Índice de polaridade estimado	Absorbância relativa (%)
10	0	5,6	76,8
9	1	5,9	81,3
8	2	6,3	94,5
7	3	6,6	88,5
6	4	7	100,0
5	5	7,3	83,3
4	6	7,6	74,4
3	7	8,0	47,4
2	8	8,3	36,0
1	9	8,7	30,0
0	10	9	18,0
95% etanol, soxhlet		5,8	95,5

Os resultados mostrados na Tabela 9 indicam que há uma faixa de eficiência máxima na extração usando etanol a cerca de 60% (g/g) em água. Este também é um resultado importante em termos de processo, já que significa que menos solvente orgânico que a quantidade normalmente utilizada é necessário; além disso, o uso de um solvente com maior quantidade de água pode prevenir a dissolução de outros componentes do fermentado (lipídios, por exemplo) no solvente, fornecendo um extrato mais puro. Por outro lado, esse resultado mostra que o fermentado não precisa passar por secagem prévia à extração com etanol, desde que se utilize solvente mais concentrado, levando em conta a incorporação de água da massa fermentada: pode-se chegar aos mesmos 60% de concentração ao adicionar, por exemplo, etanol a 95% ao fermentado úmido. Finalmente, o índice de polaridade estimado para etanol a 60% fica também próxima a 6,5 como o metanol e o DMSO. Isso corrobora a hipótese levantada de relação IP x capacidade de extração de pigmento.

Em síntese, as condições mais adequadas à extração de pigmentos de *Monascus* são etanol a 60%, na proporção 3:1 em massa de solvente em relação à massa de fermentado seco, por 12h estática ou 1h com agitação.

É importante notar que nos experimentos subseqüentes *não foram* utilizadas essas condições, mas sim etanol a 95%, por praticidade (já que é a concentração do produto comercial), e para uma comparação direta com outros dados de FSS obtidos anteriormente no LPB e por outros autores.

4.4 Comparação de diferentes substratos

Com o objetivo de comparar diferentes substratos potenciais para a produção de pigmentos de *Monascus*, 11 diferentes substratos foram testados. Esses substratos foram escolhidos por serem substratos tradicionais para FSS (no caso de arroz e trigo), resíduos agroindustriais baratos (no caso do bagaço de mandioca), ou ricos em amido e proteínas. O teor de umidade de 56% foi escolhido por ser a faixa ideal para o arroz, um pouco baixa para o bagaço de mandioca mas possivelmente próxima do ideal para outras fontes amiláceas pouco fibrosas. A quantidade de pigmentos produzida com diferentes substratos (expressa como absorbância específica a 500nm) variou bastante, como se vê na

Tabela 10. A mesma tabela mostra também a composição aproximada dos substratos (Franco, 1992). Nota-se que são todos substratos muito ricos em carboidratos (de 33 a 91%) e proteínas (9 a 48%), à exceção da mandioca e seus derivados, que possuem sobretudo amido.

Tabela 10 – Produção de pigmentos (UA₅₀₀/g substrato seco) e composição do substrato

Substrato	Composição aproximada (g/kg base seca)			Absorbância específica média (UA ₅₀₀ /g substrato seco)
	carboidratos	proteínas	fósforo	
Arroz	820	90	1,14	216
Trigo	770	140	3,63	79
Milho (quirera)	780	130	3,19	60
Soja	330	400	6,00	13
Farelo de soja	400	480	7,00	22
PTS	-	-	-	12,6
Mandioca	320	7	0,407	119,6
Tapioca	900	20	0,33	38,5
Farinha d'água	910	14	2,20	98,1
Bagaço de mandioca	660	11	-	15,7
Batata	800	100	0,96	4,7

Fonte: Franco, 1992.

Esperava-se que todos os cereais fossem bons substratos, já que o arroz (um cereal, com composição centesimal não tão distante do milho e do trigo) é o substrato tradicional para o cultivo de *Monascus*. O desempenho do trigo e do milho, embora superior ao bagaço de mandioca ou a batata, por exemplo, foi baixo em comparação com o do arroz. Era de se esperar também que substratos com um maior teor de carboidratos, proteínas ou fósforo (elemento tipicamente limitante no desenvolvimento de organismos) poderiam ser melhores meios de fermentação para *Monascus*, em comparação com o arroz. Isto também não ocorreu, como uma inspeção dos valores mostra: trigo, milho ou batata são similares ao arroz (com relação a esses nutrientes), mas apresentaram desempenho fraco. Finalmente, nota-se que para outros substratos testados a produção de cor é bastante inferior à produzida no arroz, com exceção da mandioca – cuja produção de pigmentos, embora cerca de 55% menor que a do arroz, ainda é significativamente superior à de vários outros substratos. Possivelmente o teor de umidade, sempre 56%, não foi adequado para todas as fermentações; de fato, a soja, a tapioca e a batata

aglutinaram muito mais que os outros substratos, deixando até água livre nos frascos. É possível que o desempenho desses substratos possa melhorar combinando componentes: por exemplo, misturando batata, cuja estrutura é frágil, a bagaço de mandioca. Ainda assim, os resultados da Tabela 10 permitem concluir que, em FSS de substratos puros, é adequado trabalhar com arroz ou mandioca. Finalmente, questiona-se: o que torna o arroz um substrato superior? Várias hipóteses podem ser aventadas, desde a diferença na estrutura física do suporte até a composição química. Por exemplo: o arroz é o cereal de maior poder diastásico (Aquirone *et al.*, 2002) entre os substratos testados. Assim, é concebível que haja enzimas residuais não inativadas na autoclavagem, ou que atuaram parcialmente sobre o substrato na preparação do meio de cultivo. Isso poderia aumentar a biodisponibilidade da fonte de carbono para o fungo na fermentação. Outra possibilidade é que o fungo tenha se desenvolvido nos outros substratos, mas com menor produção de cor, devido à diferente composição dos substratos.

4.5 Ensaios utilizando bagaço de mandioca como substrato

Entre os substratos testados na etapa anterior para a produção de pigmentos, o bagaço de mandioca foi escolhido para fermentações adicionais, numa tentativa de determinar condições ótimas de produção. A razão é que o bagaço de mandioca é um substrato barato (na verdade, um resíduo) de forma que mesmo uma produção mais baixa que o arroz poderia justificar seu uso economicamente.

4.5.1 Teor de umidade na FSS de bagaço de mandioca

De forma a verificar a influência do teor de umidade na produção de pigmentos, foram preparadas formulações com diferentes teores de umidade, na faixa de 60 a 90%. A 80% ou mais de umidade, os meios de cultivo tornam-se muito úmidos, com água visivelmente livre e aglutinação do substrato. A composição dos meios de cultivo e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Absorbância específica (UA_{500}/g substrato seco) de pigmentos extraídos com etanol a 95%, produzidos em FSS em bagaço de mandioca com diferentes teores de umidade

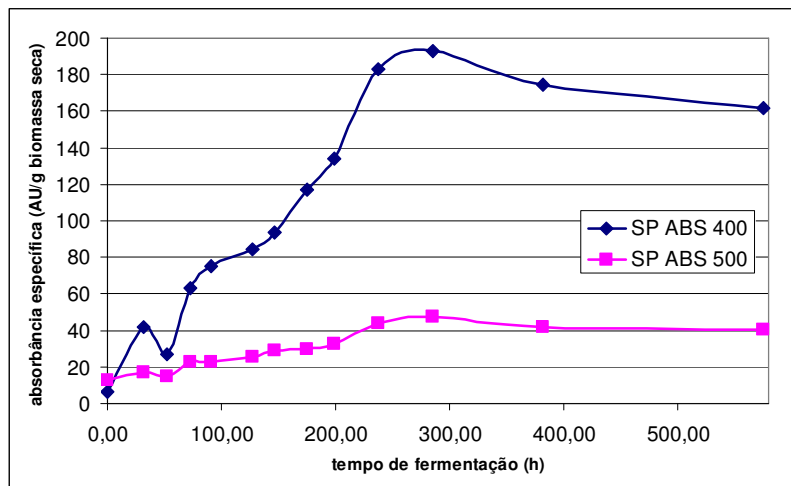
Substrato	Teor de umidade, %				
	60%	70%	80%	85%	90%
Bagaço de mandioca	13,2	25,2	6,5	3,5	10,7

Como se esperava, o bagaço de mandioca, por ser mais poroso que o arroz e apresentar um teor de fibras maior, apresenta melhor produção de pigmentos em um teor de umidade superior ao necessário para FSS em arroz. Esses resultados estão em concordância com Johns e Stuart (1991), para arroz, e Soccol e Vandenberghe (2003) para bagaço de mandioca. A partir desses resultados, as condições de fermentação (FSS) para a produção de pigmentos foram estabelecidas como: arroz, 56% de umidade (Johns e Stuart, 1991) - confirmada em experimento no LPB (dados não apresentados) e bagaço de mandioca, 70% de umidade com pH ajustado, quando necessário, a 6,5, e temperatura de incubação de 32°C. Esse experimento foi feito em 7 dias; como o tempo de fermentação ideal depende largamente da qualidade do inóculo e do substrato, para a produção industrial é necessário acompanhar a cinética de produção de pigmento em cada fermentação. Ainda assim, dados cinéticos podem ser levantados para permitir uma avaliação do período médio de fermentação:

4.5.2 Cinética de produção de pigmentos em bagaço de mandioca

Com o objetivo de determinar a cinética de produção de pigmentos em bagaço de mandioca, uma fermentação foi feita com a duração de 24 dias, obtendo-se como resultados as curvas de produção de pigmentos apresentadas na Figura 15. A produção máxima de pigmentos ($ABS_{SP\ 500} = 47UA/g$) se dá com 10 a 11 dias, o que é um período superior ao de fermentação de arroz usando o mesmo inóculo (dados não ilustrados). Esse resultado pode ser devido a uma biodisponibilidade maior do amido de arroz em relação ao de mandioca, ou a uma menor quantidade de oligoelementos ou vitaminas.

Figura 15 – Produção de pigmentos de *Monascus* em FSS de bagaço de mandioca, expressa como absorbância específica (em UA/g substrato seco) em função do tempo (em horas)



A análise da Figura 15 também mostra que a absorbância dos pigmentos é maior a 400nm, comparando com a absorbância a 500nm, mas com uma boa proporcionalidade. Muitos autores usam a relação ABS_{500}/ABS_{400} para indicar a proporção de pigmentos vermelhos em relação aos amarelos; como nesta fermentação a relação é aproximadamente constante, a ABS_{400} pode ser usada para mostrar a evolução da formação de pigmentos para baixas concentrações, por apresentar resposta mais sensível.

Para utilizar bagaço de mandioca como substrato para produção de pigmentos por *Monascus*, o meio de cultivo teria de ser suplementado com uma fonte de nitrogênio, fósforo ou oligoelementos, que poderia melhorar a produção ou produtividade de pigmentos; os experimentos a seguir pretendem avaliar essa possibilidade.

4.5.3 Otimização das condições de cultivo em bagaço de mandioca.

O bagaço de mandioca é um substrato rico em amido, que foi usado com sucesso em diversos processos de fermentação em substrato sólido. Com o objetivo de maximizar a produção de pigmento a partir do bagaço de mandioca, um planejamento experimental 3^{3-1} com 10 pontos extras (6 pontos completando os

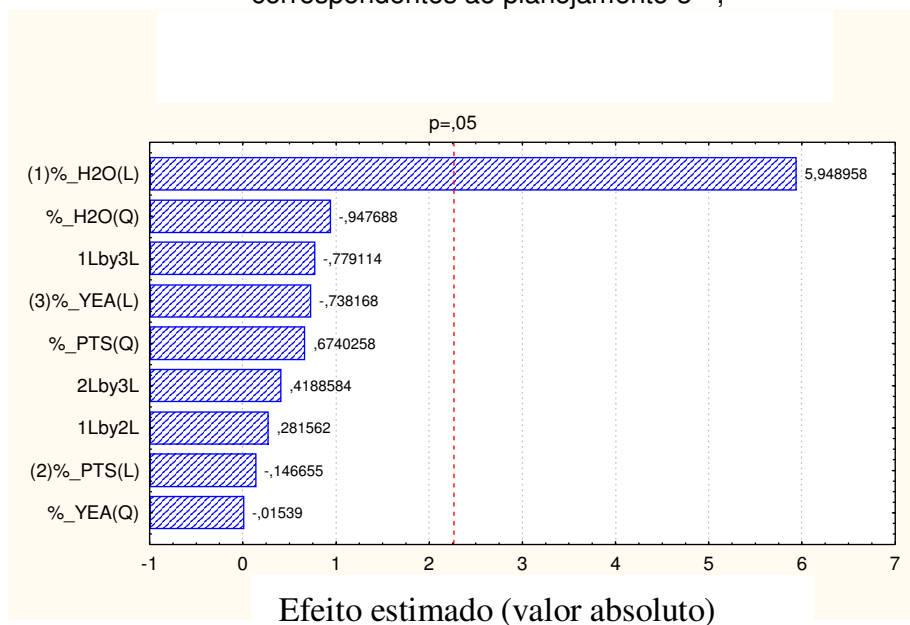
centros dos planos, uma repetição do ponto central e três repetições dos níveis mínimos, totalizando $9 + 6 + 1 + 3 = 19$ pontos) foi realizado utilizando bagaço de mandioca em quantidade fixa, teor de umidade variável e proteína texturizada de soja (PTS) e levedura de panificação inativada (YEA) como aditivos, em níveis variáveis. Tanto PTS como YEA são fontes de nitrogênio orgânico de custo relativamente baixo, e YEA representa também uma fonte de oligoelementos e vitaminas. A Tabela 12 mostra a composição dos meios de cultivo e os resultados obtidos.

Tabela 12 – Composição dos meios de cultivo e produção de pigmentos no planejamento experimental 33-1 – umidade, PTS, YEA para fermentação de bagaço de mandioca

frasco	% H ₂ O	% PTS	% YEA	Produção de pigmento (UA ₅₀₀ /g matéria seca inicial)	frasco	% H ₂ O	% PTS	% YEA	Produção de pigmento (UA ₅₀₀ /g matéria seca inicial)
1	50	0	0	0,40	11	60	5	4	8,00
2	50	10	0	0,55	12	70	0	0	23,70
3	50	5	2	0,20	13	70	10	0	23,00
4	50	0	4	0,70	14	70	5	2	23,70
5	50	10	4	0,10	15	70	0	4	15,30
6	60	5	0	3,40	16	70	10	4	18,05
7	60	0	2	3,65	17	50	0	0	0,30
8	60	5	2	4,80	18	60	0	0	15,85
9	60	5	2	20,50	19	70	0	0	20,50
10	60	10	2	3,05					

A análise dos resultados mostra uma grande variação de valores para a absorbância específica; fica claro, no entanto, que para teores mais baixos (50 e 60%) de umidade, todos os experimentos apresentam baixa produção de pigmentos, enquanto para 70% de umidade a produção é mais alta. A Figura 16 mostra não apenas que a maior umidade favorece a produção de pigmentos (com um efeito positivo, ao nível de 95% de confiança), como a presença YEA e PTS não afeta a produção de pigmentos.

Figura 16 – Diagrama de Pareto para os efeitos lineares e quadráticos dos fatores avaliados, correspondentes ao planejamento 3^{3-1} ,



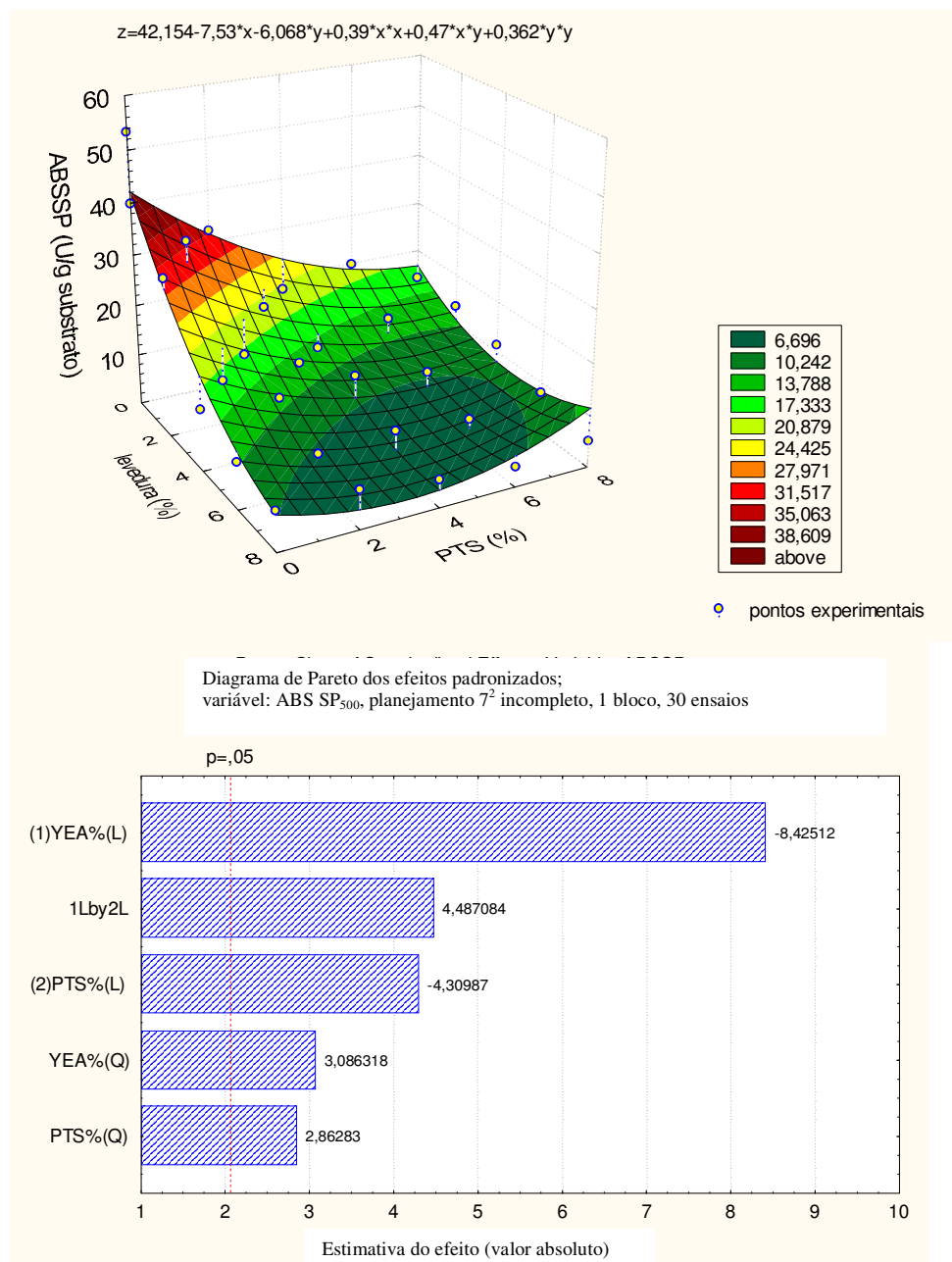
O resultado mostrado por esse planejamento foi inesperado, na medida em que, supunha-se, os aditivos YEA e PTS favoreceriam o crescimento do fungo – ou pelo menos não atrapalhariam. Como a umidade mostrou-se o fator determinante, com maior eficiência ao nível de 70%, preparou-se um novo plano experimental, com o teor de umidade nesse patamar e pesquisando melhor uma área de valores de YEA x PTS. A Tabela 13 mostra os valores usados de YEA e PTS, e a resposta correspondente após 11 dias de fermentação, tempo suficiente para haver boa produção de pigmentos, permitindo a avaliação dos meios de cultivo.

Tabela 13 – composição dos meios de cultivo e valor de absorbância específica correspondente, em planejamento 7^2 incompleto YEA x PTS em bagaço de mandioca.

Frasco	BM (g)	YEA (% sobre o bagaço)	PTS (% sobre o bagaço)	ABS SP 500 (UA/g matéria seca inicial)	Frasco	BM (g)	YEA (% sobre o bagaço)	PTS (% sobre o bagaço)	ABS SP 500 (UA/g matéria seca inicial)
1	10	0	0	53,3	16	10	4	2	10,7
2	10	0	2	32,1	17	10	4	4	11,6
3	10	0	4	17,4	18	10	4	6	9,0
4	10	0	6	19,8	19	10	4	8	11,3
5	10	0	8	14,1	20	10	6	0	9,0
6	10	1	1	33,9	21	10	6	2	6,8
7	10	1	3	18,0	22	10	6	4	7,5
8	10	2	0	30,8	23	10	6	6	6,1
9	10	2	2	12,9	24	10	6	8	8,0
10	10	2	4	11,1	25	10	8	0	7,6
11	10	2	6	14,0	26	10	8	2	7,5
12	10	2	8	13,5	27	10	8	4	5,3
13	10	3	1	12,6	28	10	8	6	3,9
14	10	3	3	12,7	29	10	8	8	5,1
15	10	4	0	12,0	30	10	0	0	39,9

Os resultados de absorbância apresentados na Tabela 13, proporcionais à produção de pigmentos, podem ser melhor apreciados através da Figura 17, em que uma função polinomial foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados aos pontos experimentais, usando o programa Statistica:

Figura 17 – (a) Influência da concentração (%) em YEA e PTS na absorbância específica do fermentado. A curva plotada é a função obtida por regressão polinomial (mínimos quadrados) dos valores experimentais. (b) Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis YEA e PTS sobre a produção de pigmentos.



A inspeção da Figura 17a permite concluir que a adição de leveduras ou de PTS realmente *desfavorece* a produção de pigmento. A Figura 7b indica efeitos lineares negativos, tanto para PTS como para YEA. Note-se que os efeitos positivos de interação e quadráticos, não independentes, são apenas consequência da

magnitude dos efeitos lineares (Carvalho, 1999). Não se espera que os aditivos YEA e PTS realmente atrapalhem ambos o desenvolvimento do fungo, pelo menos em níveis modestos (1 a 2%). Dessa forma, o que pode explicar a produção menor de pigmentos é que a adição desses componentes favoreceu um desvio de metabolismo, retardando ou diminuindo a produção de pigmentos. Essa hipótese poderia ser testada pela quantificação da biomassa produzida. Como, no entanto, o objetivo era produzir pigmentos de *Monascus* de forma suficientemente eficiente para permitir estudos de respirometria para futuro escalonamento, decidiu-se mudar o substrato de trabalho exclusivamente para arroz integral, já que trata-se efetivamente do melhor substrato testado anteriormente.

4.6 Desenvolvimento do método de análise de biomassa via ergosterol

Para determinar a equivalência entre a absorbância e as concentrações de ergosterol na análise cromatográfica, 10µL de hexano puro e 10µL de três padrões de ergosterol, com 1000, 5000 e 10000 µg/mL foram injetados de acordo com o método descrito (vide Material e Métodos). A partir das áreas dos picos, obteve-se por regressão linear a seguinte expressão para a concentração de ergosterol: ergosterol (µg/mL) = $5,54 \cdot 10^{-5} \cdot A$, com $R^2 = 0,999$ (A é a área do pico).

A recuperação estimada de 10% foi feita procedendo-se à extração, segundo o mesmo processo aplicado às amostras, de 0,5 g de arroz dopado com 2000µg de ergosterol, o que forneceu uma massa de ergosterol de 198µg na análise. É uma recuperação baixa, devida possivelmente à partição pouco seletiva do ergosterol entre o hexano e a fase alcoólico-aquosa. Levando em conta, no entanto, que as análises foram feitas da mesma forma, com idênticos volumes de solventes, podemos supor que os teores de ergosterol nos extratos guardam boa proporção com o teor na biomassa. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que os dados de biomassa (via ergosterol) e produção de pigmentos (ABS SP 500) mostram boa correlação para diversas fases do cultivo (ver item 4.2).

Para estimar a equivalência entre biomassa e concentração de ergosterol, foi analisada uma amostra de 0,4g de biomassa seca à temperatura ambiente com sílica. Após a extração e injeção, obteve-se um pico de área $A = 18283018$, o que equivale a 1013 µg/mL no extrato. Considerando que o volume de diluição dos

extratos é 0,200 mL, a massa de ergosterol é de $1013\mu\text{g}.\text{mL}^{-1} \times 0,2 \text{ mL} = 202,6 \mu\text{g}$ nos extratos. Como a recuperação de ergosterol na extração foi de 10%, a massa de ergosterol na biomassa é de 2026 μg . Temos, portanto, que a proporção ergosterol:biomassa seca é $2026 \mu\text{g}:0,4\text{g} = 5,06 \text{ mg/g}$, resultado próximo da expectativa, comparando com os resultados de outros autores, discutido em material e métodos. Temos então que: $\text{biomassa na amostra}(\text{mg}) = 5,54.10^{-5}.\text{ABS}.0,2 / 506,4$. Os valores obtidos são usados na análise respirométrica à frente.

4.7 Determinação da aeração adequada, em coluna de Raimbault

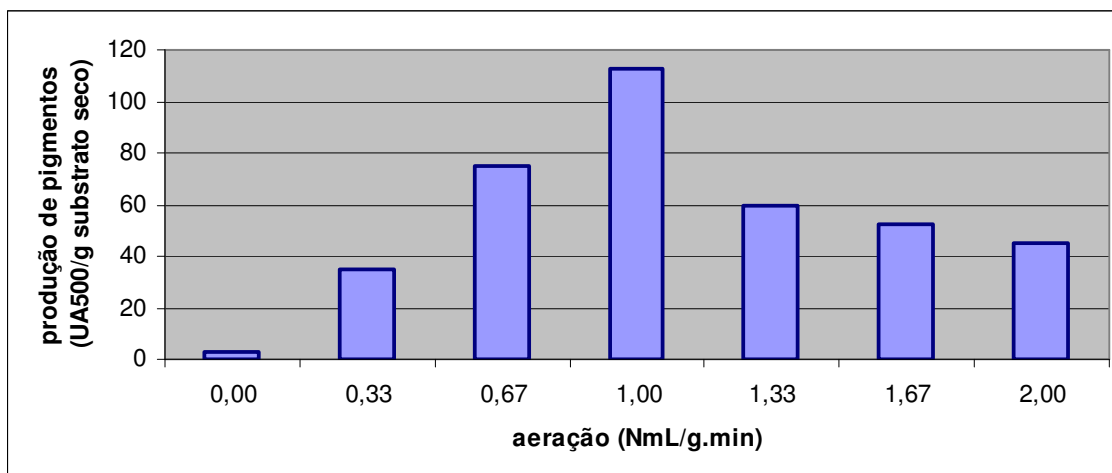
Para a determinação da aeração ótima para fermentação em arroz, foi feito um ensaio em colunas de Raimbault contendo 60g de arroz com 56% de umidade. O meio foi inoculado com 5%(v/m) de suspensão de esporos com 10^6 esporos/mL, e incubado a 32°C em montagem ilustrada na Figura 18, resultando em maior produção de pigmentos para uma velocidade de aeração de 60NmL./min

Figura 18 – Sistema de respirometria (colunas, cromatógrafo e computador). Ao fundo (esquerda) se vê o fermentador piloto de 30kg. No detalhe (direita), uma coluna de FSS parcialmente preenchida.



Os resultados de absorvância específica, proporcional à produção de pigmentos, são mostrados na Figura 19, como função da vazão de ar utilizado:

Figura 19 – Efeito da aeração na produção de pigmentos (como ABS SP) em arroz, a 32 °C

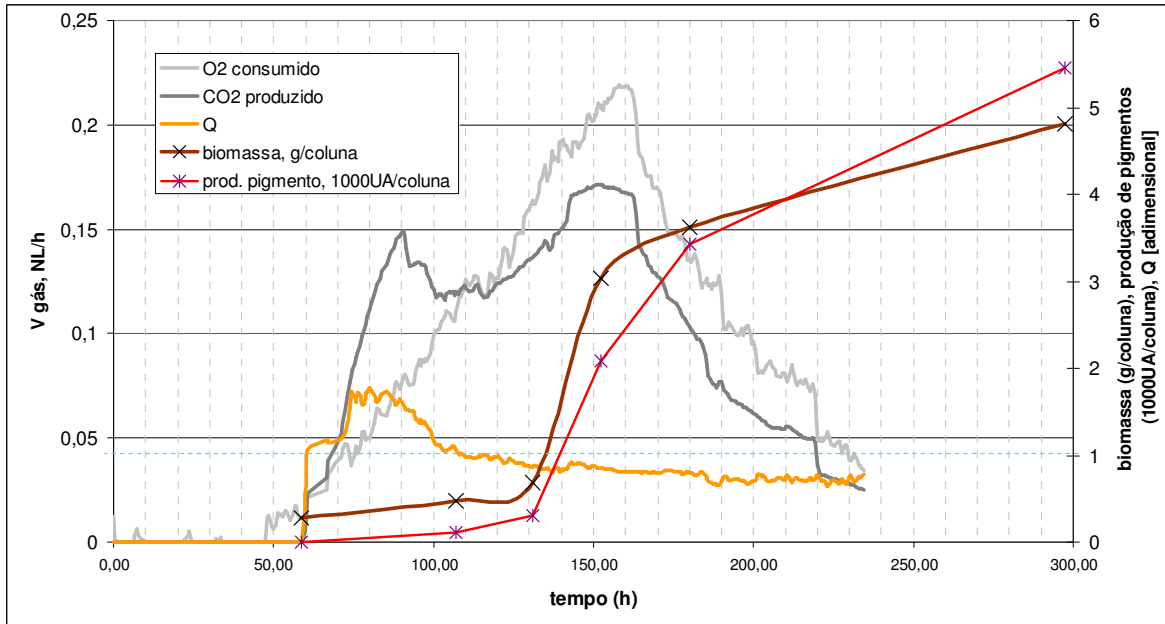


A análise do gráfico mostra que a velocidade de aeração mais adequada é da ordem de 1 NmL/g.min (1 mililitro de ar em condições padrão, por grama de substrato úmido, por minuto). Nos experimentos subsequentes em coluna, foi feito o controle da aeração nesse valor, usando-se um rotâmetro de fluxo à saída das colunas.

4.8 Análise respirométrica em colunas

Para a determinação da cinética de produção de pigmentos e de biomassa em arroz, foi feito um experimento em colunas, com a montagem da Figura 18, com colunas de Raimbault com 60g meio inoculado com 5% v/m de suspensão de esporos com 10^6 esporos/mL. Os resultados de concentração de O_2 e CO_2 (obtidos por cromatografia gasosa), biomassa (obtidos via ergosterol, por cromatografia líquida de extratos de amostras dos fermentados) e pigmentos (obtidos por extração do pigmento e leitura da absorvância) foram tabulados em planilha de cálculo e apresentados a seguir (Figura 20):

Figura 20 – Resultados da análise respirométrica em colunas com arroz como substrato – consumo horário de O₂, produção horária de CO₂, produção de pigmentos (como ABS SP₅₀₀), produção de biomassa e quociente respiratório Q.



Adaptando curvas sigmoidais (Equação de Boltzmann) aos dados de biomassa e de pigmento produzido, obtém-se as seguintes expressões (Eq. 1 e 2):

$$\text{Biomassa (g)} = [(0,1778 - 4,7352) / (1 + e^{(\text{tempo}-152,09)/16,83})] + 4,7352 \quad (\text{Eq.1})$$

com ($R^2 = 0,950$)

$$\text{ABS SP}_{500} \text{ (UA/g)} = [(0 - 5459) / (1 + e^{(\text{tempo}-166,30)/18,13})] + 5459 \quad (\text{Eq. 2})$$

com ($R^2 = 0,980$)

Essas equações foram usadas para gerar os gráficos a seguir (Figura 21a e Figura 22), usando o programa MS-EXCEL. O cálculo das velocidades específicas foi feito ponto a ponto, pelas expressões: $\mu \sim X^{-1} \Delta X / \Delta t$, e $q_p \sim X^{-1} \Delta P / \Delta t$. A Figura 21b mostra os valores do logaritmo da biomassa por coluna, ao longo da fermentação.

Figura 21 – a) Biomassa e pigmentos produzidos ao longo da fermentação (modelo sigmoidal adaptado aos dados experimentais) e b) logaritmo da biomassa real x tempo

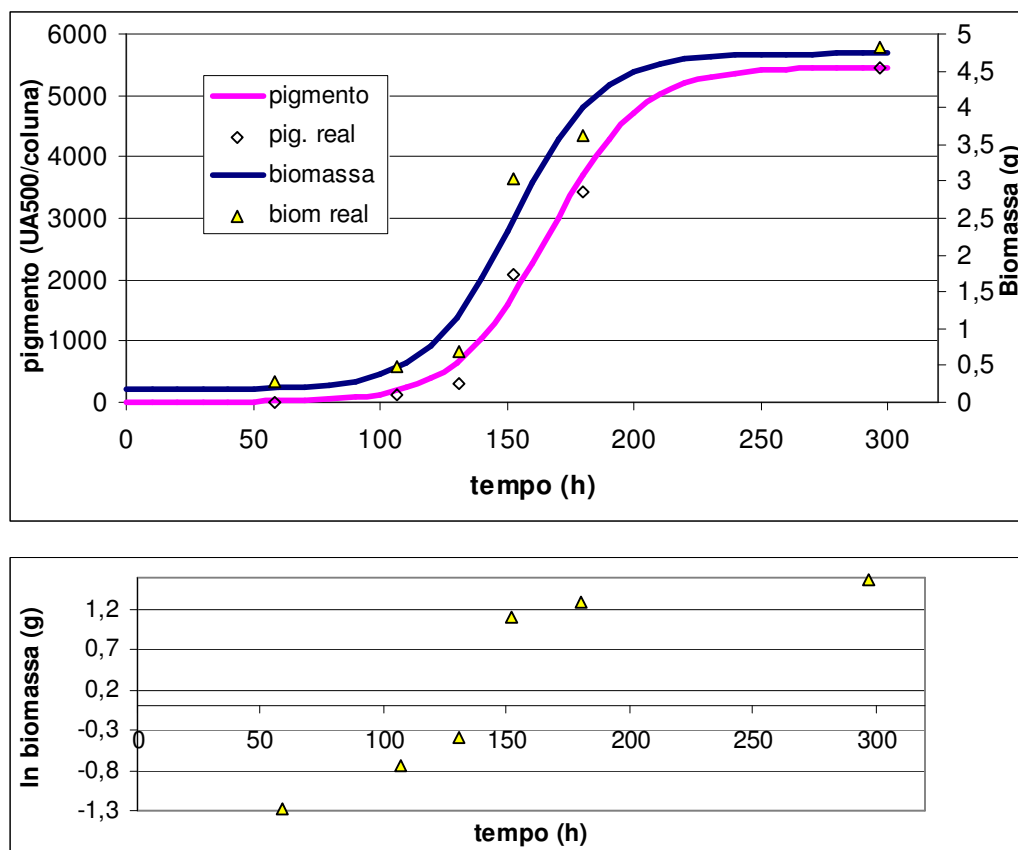
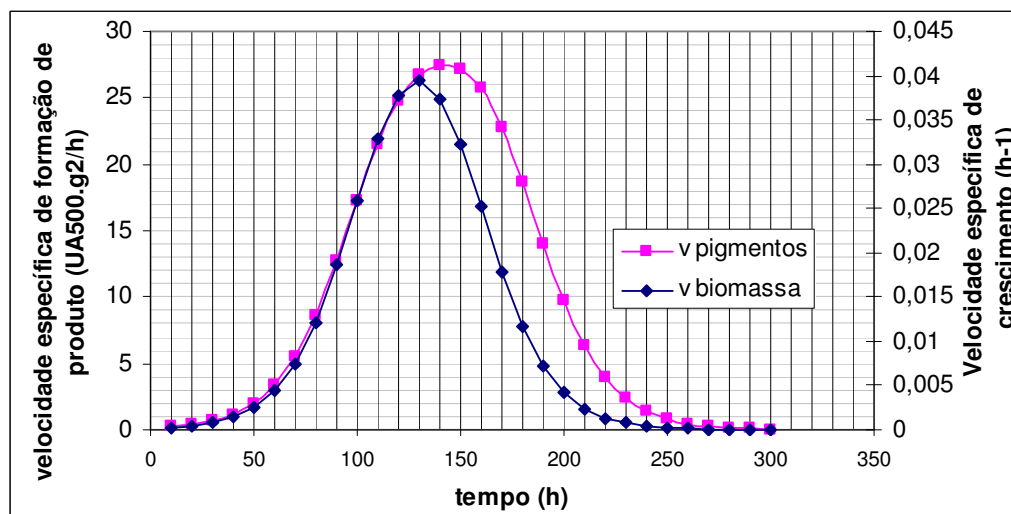


Figura 22 – Velocidade específica de formação de pigmentos e de biomassa, baseado no modelo sigmoidal.



A análise da Figura 20, da Figura 21 e da Figura 22 poderia ser discutida para cada grandeza, mas pode ser vantajosamente dividida por fases, pela análise da curva de Q (quociente respiratório) e de biomassa e pigmentos:

4.8.1 Fases da fermentação:

0 a 60h – fase lag: Essa fase representa a adaptação ao meio de cultivo e a germinação dos esporos, de forma que a quantidade de CO₂ produzida (e diluída pela corrente de aeração) provavelmente é baixa demais para ser detectada pelo cromatógrafo – tanto que o quociente respirométrico Q calculado é nulo para tempos inferiores a 60h. A biomassa e o pigmento detectados também apresentam valores baixos. Note-se que 60h é uma fase lag excessivamente grande para fermentações industriais, e denota a necessidade de aumentar a concentração ou a forma de inoculação, trabalhando em um pré-fermentador.

60 a 90h – fermentação: A partir de 60h e até cerca de 85h o valor de Q aumenta, chegando a um valor máximo próximo de 2, o que indica uma atividade respiratória grande, com CO₂ formado superior ao O₂ consumido (em um processo de respiração ideal, $Q = 1$). Portanto, deve-se formar outro metabólito que não exclusivamente CO₂. De fato, o odor do fermentado no início da fermentação é de álcool, o que também foi observado por outros autores (Pastrana *et al.*, 1995, Rosenblitt *et al.*, 2000). A aeração, contudo, deveria ser suficiente para o desenvolvimento aeróbico da pouca biomassa presente nessa fase; possivelmente trata-se de um efeito tipo Crabtree, observado por outros autores (Chen e Johns, 1994; Hamdi *et al.*, 1996) em fermentação submersa.

90h a 140h – mudança para respiração: Nessa fase diminui Q, até um valor próximo a 0,8 e começa a aumentar a produção de biomassa e de pigmentos; o consumo de O₂ e a produção de CO₂ atingem um máximo ($t = 150$ a $160h$). Nessa fase, como pode-se verificar pela grande variação do \ln da biomassa na Figura 21b, o desenvolvimento do micélio é bastante grande, chegando ao máximo valor estimado de $\mu = 0,039 \text{ h}^{-1}$, para $t = 130h$. A produção específica de pigmentos também é máxima, atingindo $27,50 \text{ UA.g}^{-2}.\text{h}^{-1}$ para $t = 140h$ (valores obtidos pela derivação da curva modelo $X=f(t)$, que podem ser verificados na Figura 22.

140h ao fim da fermentação – respiração e síntese de pigmentos: Nessa fase Q permanece constante, na faixa de 0,8. O consumo de O₂ e a produção de CO₂ também são constantes; há formação de grande quantidade de pigmentos, o que é consistente com a formação de metabólitos secundários (Pandey, 2001). A velocidade específica de formação de biomassa e de pigmentos diminui (Figura 21). Isso denota a desaceleração do crescimento, que deixa de ser exponencial. A partir de 280h, a produtividade de pigmentos (0,76 UA/g.h) é cerca de 10 vezes inferior à produtividade máxima, de cerca de 74 UA/g.h às 170h de fermentação.

4.8.2 Determinação dos parâmetros da fermentação usando o programa FERSOL

O programa FERSOL utiliza dados de oxigênio consumido e biomassa produzida para estimar os parâmetros de fermentação para o modelo (Eq. 3):

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:

dO_2/dt é a taxa de consumo de oxigênio, em g/h;

$Y_{x/o}$ é a relação entre biomassa formada e oxigênio consumido [unid biomassa/unid O₂]

dX/dt é a taxa de produção de biomassa, em g/h

m é um coeficiente de manutenção, refletindo a quantidade de O₂ usada para outras funções que não a produção de biomassa, em h⁻¹

X é a quantidade de biomassa no sistema, em g

Foram aplicados ao programa os dados constantes na Tabela 14:

Tabela 14 – valores de tempo, biomassa e pigmento produzidos, O₂ consumido e conversões de substrato e oxigênio em biomassa e pigmento, usados para a estimativas de parâmetros cinéticos.

tempo de fermentação, h	Biomassa produzida, mg/coluna	Pigmento produzido UA ₅₀₀ /coluna	O ₂ consumido, mmol/h	O ₂ acum	Yp/s mg/g	Yx/s g/g	Yp/o g/mol	Yx/o g/mol
0	30	0	0	-	-	-	-	-
59	278	0	0,224	0,01	0	0,0219	0	-
107	480	109,7	4,804	136	0,109	0,0298	0,0121	3,3100
131	681	313,5	7,227	275	0,268	0,0372	0,0171	2,3687
152	3040	2082,3	9,283	454	1,503	0,1449	0,0688	6,6290
180	3625	3423,3	6,261	683	2,088	0,1463	0,0751	5,2635
297	4816	5458,9	0	915	3,335	0,1950	0,0894	5,2307

A partir dos valores de tempo, biomassa e O_2 consumido da Tabela 14, chegou-se aos seguintes valores utilizando o programa FERSOL: $Y_{x/o} = 3,703$ g biomassa/mol O_2 , $m = 0,000$ h^{-1} e $\mu_{max} = 0,038$ h^{-1} , na faixa de 59 a 180 h, com coeficiente de regressão $R^2 = 0,989$ – um valor que indica boa correlação entre os dados e o modelo. O valor de $m \sim 0$ indica, na verdade, que o valor é pequeno demais para ser estimado pelo programa, o que mostra que a produção de biomassa deve ser muito superior à de pigmentos (ou outros metabólitos que exijam o consumo de oxigênio). Essa hipótese é reforçada pelos pequenos valores de $Y_{P/S}$, de 0,00335 e $Y_{P/O}$ de 0,0894 ao final da fermentação, mostrando que as conversões de substrato e oxigênio em pigmentos são bem inferiores às conversões em biomassa. O valor de $Y_{x/o}$ obtido através do programa é próximo do valor obtido pelo cálculo direto dos parâmetros cinéticos apenas na faixa próxima a 107h de fermentação. O valor encontrado para μ_{max} é próximo ao obtido com o modelo sigmoidal, de $\mu_{max} = 0,039$ h^{-1} . Esse valor indica que uma fermentação com *Monascus* poderia ter seu tempo reduzido a cerca de 130h, partindo da mesma concentração inicial de biomassa, se as condições de inoculação e incubação fossem tais que a fermentação se desse exclusivamente em fase exponencial.

Ao final da fermentação em coluna, obteve-se 17mg de pigmento/g de biomassa, um valor próximo ao obtido em fermentação submersa por Hajjaj (2000), estimado através de um gráfico em 16,8mg de pigmento/g de biomassa. No entanto, na FSS esse pigmento está menos disperso, na proporção de cerca de 5g pigmento/kg de fermentado úmido (com cerca de 60% de umidade), contra cerca de 0,1g pigmento/L na fermentação líquida.

4.9 Correlação biomassa-pigmento

Uma análise de correlação dos dados apresentados na Tabela 14, de biomassa e pigmento produzidos, apresenta coeficiente $R = 0,977$, o que sugere uma razoável proporcionalidade entre ambos os fatores. Usando mais dados de biomassa x absorvância (

Tabela 15), chega-se à expressão (Eq. 4):

$$\text{Biomassa} = -2.10^{-06} \cdot \text{ABSSP}^2 + 0,0028 \cdot \text{ABSSP} + 0,0302, \quad (\text{Eq. 4})$$

com $R^2 = 0,9955$

onde:

biomassa: biomassa no fermentado seco (g/g)

ABSSP: absorvância específica, em UA/g substrato seco

Tabela 15 – biomassa e ergosterol em diferentes fases de fermentação de arroz – dados para correlação.

ABS SP 500 UA/g	biomassa g/g
0	0,01591
1,29	0,04040
3,68	0,03499
12,57	0,06044
112,8	0,35717
315,8	0,71838
269,5	0,58909
232,8	0,59636
291,7	0,68121
499,9	0,93737

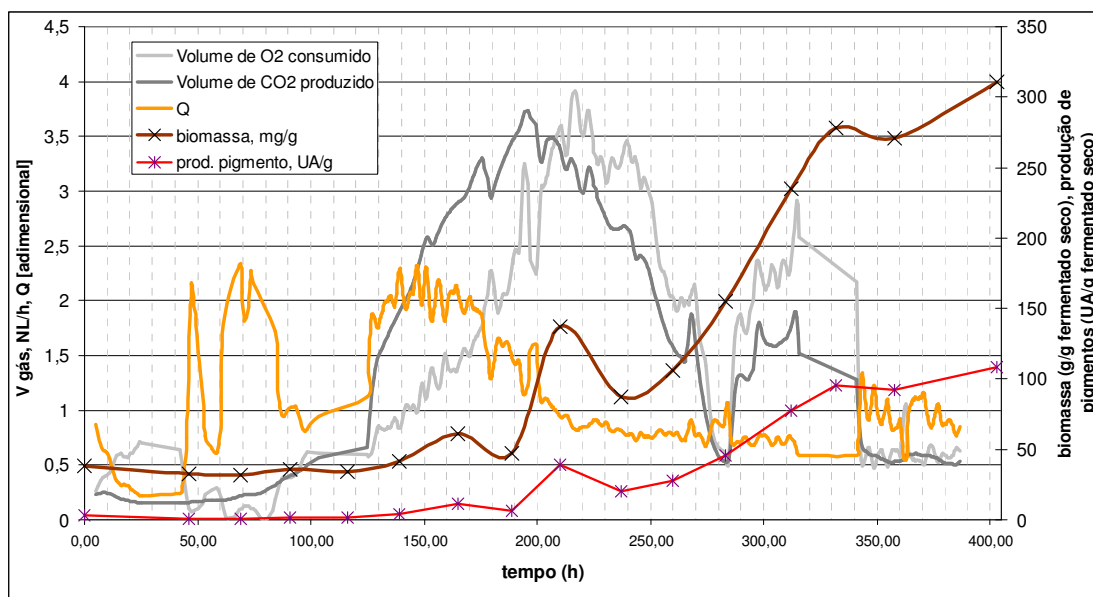
Embora essa expressão deva ser usada com ressalvas, pois deve depender da cepa utilizada e das condições de cultivo, é uma forma simples de estimar a biomassa na fermentação, já que a extração de pigmentos e leitura de absorvância é uma análise mais simples que a extração do ergosterol e a análise cromatográfica.

4.10 Cinética de fermentação em reator do tipo tambor horizontal

Para verificar o comportamento do sistema de fermentação com um aumento de escala, uma nova fermentação foi feita, utilizando as mesmas condições da fermentação em coluna (arroz com 56% de umidade, inoculado com suspensão de esporos, temperatura controlada em 32°C). A massa de meio a fermentar foi de 2400g, 40 vezes maior que a utilizada em colunas, de forma que a aeração foi mantida na mesma proporção (1Nml/g.min), ou seja, 2,4NL/min. Portanto, o critério de escalonamento utilizado foi uma razão vazão de ar/massa de meio constante. Como o reator utilizado não tem camisa de aquecimento, este foi feito através do aquecimento do ar, após a umidificação, imediatamente antes da entrada no reator. Um isolamento térmico foi feito no reator, e um sensor de temperatura foi colocado

próximo à saída de ar do reator, ligado a um termostato e um aquecedor foram usados para controlar a temperatura do sistema. Ainda assim, houve oscilação de temperatura, especialmente no 5º dia de fermentação, além de duas quedas de energia que causaram flutuações nas leituras do cromatógrafo. Os resultados apresentam a mesma tendência observada na fermentação em coluna (Figura 23).

Figura 23 – Resultados da análise respirométrica em biorreator tipo tambor utilizando arroz como substrato – consumo horário de O_2 , produção horária de CO_2 , produção de pigmentos (como ABS SP₅₀₀), produção de biomassa e quociente respiratório.



A análise da Figura 23 permite observar o mesmo padrão fermentativo presente nas fermentações em colunas. Novamente, o quociente respiratório Q pode ser usado como referência para classificar as fases da fermentação: abaixo de 80h há uma fase de crescimento muito pequeno, de 80 a 150h um metabolismo predominantemente anaeróbico, com $Q > 1$ e pequeno aumento na produção de biomassa; de 150 a 220h há um declínio no Q , que estabiliza na faixa de 0,8, ainda com aumento na produção de pigmentos e de biomassa; de 220 a 350h a produção de pigmentos e de biomassa é alta, com Q em uma faixa aproximadamente constante. O forte declínio na quantidade de oxigênio consumido e CO_2 produzido, na vizinhança de 280h, sugere problemas de análise, pois contrasta com a forte produção de pigmentos e de biomassa.

Adaptando novamente um modelo sigmoidal aos valores de produção estimada de biomassa x tempo e produção de pigmento x tempo, obtém-se as seguintes expressões (Eq. 5 e 6):

$$\text{biomassa (g)} = [(46,114 - 341,55) / (1 + e^{(\text{tempo}-283,8)/35,666})] + 341,55 \quad (\text{Eq. 5})$$

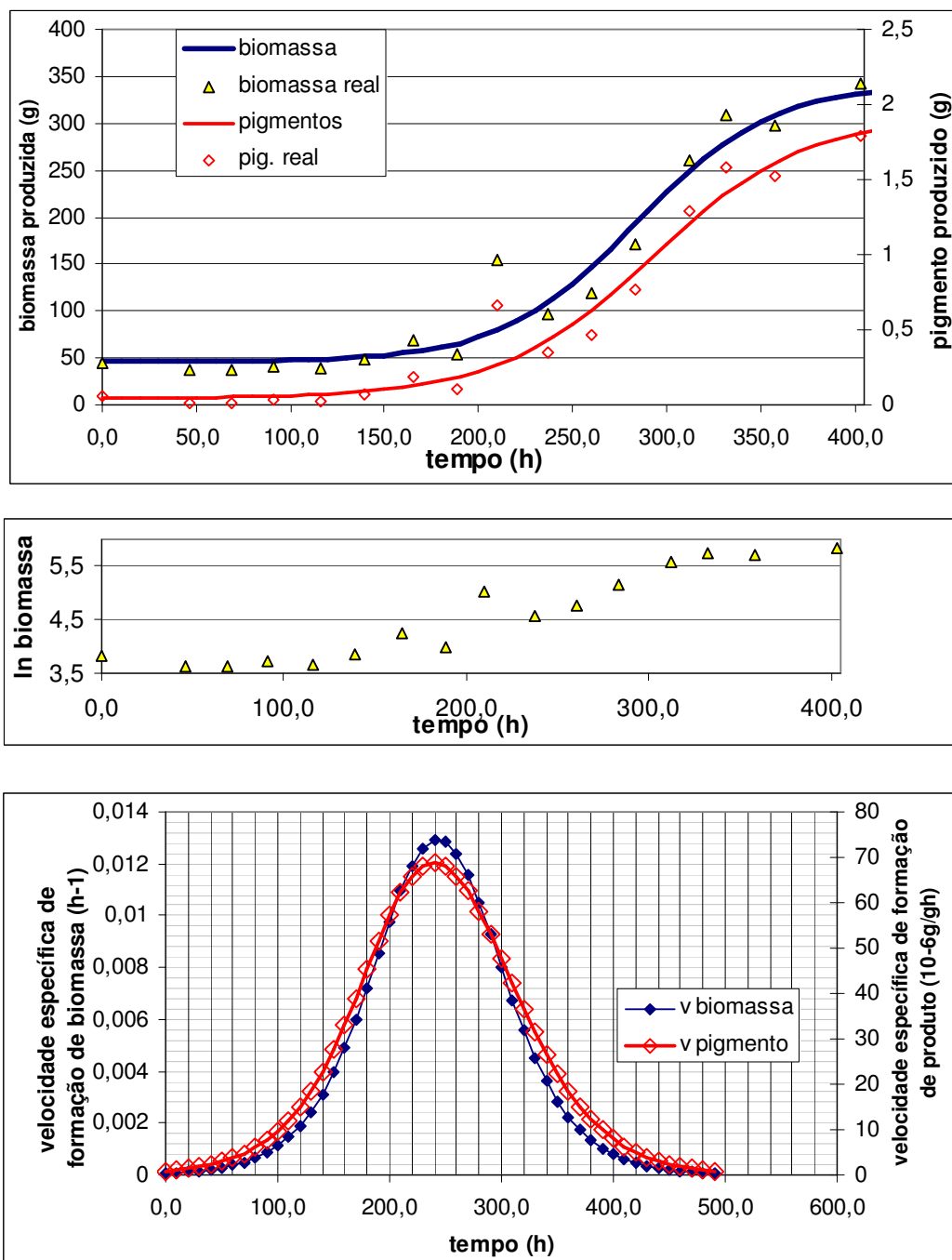
com ($R^2 = 0,953$)

$$\text{ABS SP}_{500} \text{ (UA)} = [(3038 - 129000) / (1 + e^{(\text{tempo}-292,9/40,894})] + 129000 \quad (\text{Eq. 6})$$

com ($R^2 = 0,957$)

Essas equações foram usadas para gerar os gráficos a seguir (Figura 24), usando o programa MS-EXCEL. O cálculo da velocidade específica de crescimento foi feito ponto a ponto, pelas expressões: $\mu \sim X^{-1} \Delta X / \Delta t$, e $q_p \sim X^{-1} \Delta P / \Delta t$

Figura 24 – (a) Biomassa e pigmentos produzidos ao longo da fermentação (modelo sigmoidal adaptado aos dados experimentais). (b) logaritmo da biomassa produzida x tempo (c) Velocidade específica de formação de pigmentos e de biomassa, baseado nesse mesmo modelo.



A inspeção da Figura 24 permite concluir que o modelo sigmoidal representa de forma satisfatória a produção estimada de biomassa. A velocidade específica máxima de crescimento é $\mu_{\max} = 0,013\text{h}^{-1}$, um valor sensivelmente inferior ao obtido

em coluna, possivelmente devido ao controle deficiente de temperatura e eventualmente à formação de caminhos preferenciais no leito do fermentador, diminuindo a aeração efetiva (embora em cada amostragem diária se homogeneizasse o meio, desfazendo grumos). A velocidade específica de formação de produto foi de cerca de 70µg pigmento/g biomassa.h, ou 4,7 UA/g.h, e a produção total de pigmentos foi de 108,7 UA/g de fermentado seco.

4.11 Comparação da produção em frascos, colunas, bandeja e reator tipo tambor horizontal, com arroz como substrato

Os seguintes valores de produção de pigmentos foram obtidos com diversos métodos de fermentação (Tabela 16).

Tabela 16 – Comparação da produção de pigmentos em diferentes quantidades de substrato (arroz) e condições de fermentação em FSS

Método	Massa de substrato úmido	Aeração	Tempo de fermentação	Teor de sólidos ao final da fermentação	Pigmento produzido (UA₅₀₀/g de fermentado seco)
Fermentação em frascos de vidro	20g	Difusão	7 dias	86%	89,3
Bandeja	200g	Difusão	8 dias	85,5%	117,78
Fermentação em coluna	60g	Forçada	12 dias	19,9%	499,9
Fermentação em reator	2400g	Forçada	16 dias	22,6%	108,7

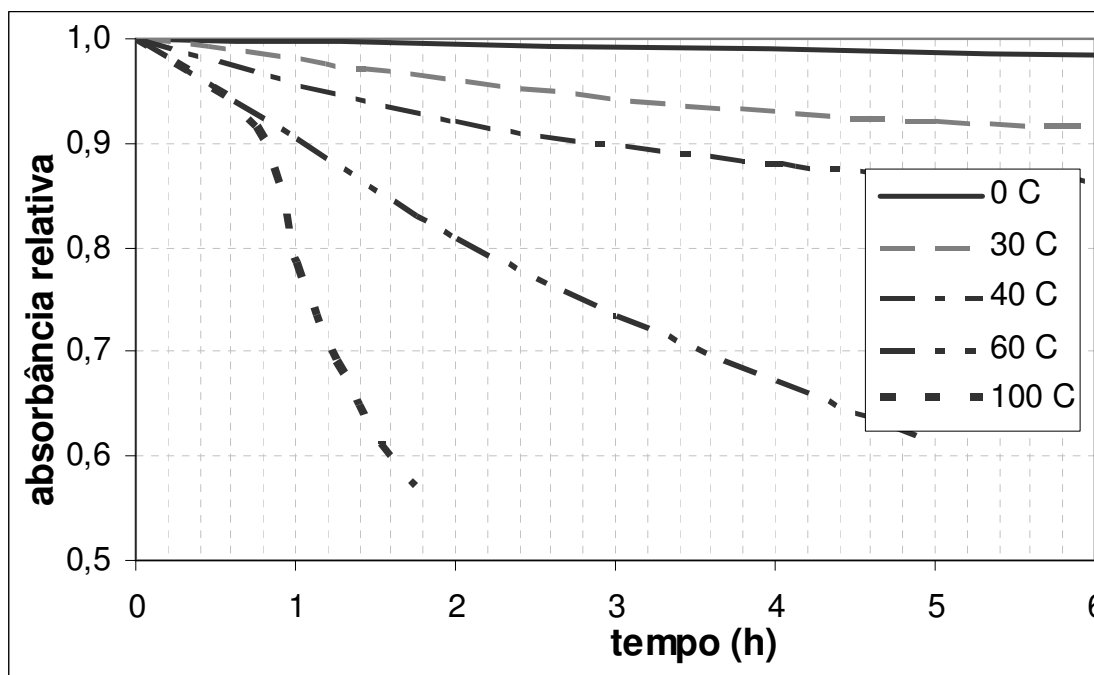
Nota-se que a produção de pigmentos em frasco e em bandeja é próxima; o tempo de fermentação para máxima produção de cor é semelhante, e ocorre secagem do meio, mesmo tentando-se incubar o material em estufa com ar saturado de umidade. A produção de pigmentos em coluna é, em média, 5 vezes superior à produção em frascos e bandeja, o que pode ser atribuído ao efeito da aeração forçada, e não haver secagem do meio de cultivo. A produção em reator que, esperava-se, deveria ser semelhante à produção em coluna, revelou-se inferior a todas as outras, levando em conta que a produção se deu em 16 dias, com uma produtividade mais baixa (15 vezes inferior aos 74UA/g.h obtidos em coluna). A causa dessa produção relativamente baixa pode ser uma deficiência na aeração, e

provavelmente há grande influência de oscilações de temperatura. Nota-se também a importância de controlar a umidade, já que nos sistemas sem aeração forçada (frascos e bandeja) o meio secou ao longo da fermentação, chegando a cerca de 15% de umidade ao final do processo. É provável que, com a umidade mantida em um valor mais alto, a produção em bandeja fosse maior. Possivelmente, para uma melhor produção em bandejas, a umidade deve ser controlada pela aspersão direta de água (já que usar ar saturado com água não foi eficiente) e para uma melhor produção em reator, é necessário controlar de forma eficiente a temperatura. Uma forma de controlar a temperatura do reator é controlando rigorosamente a temperatura de entrada do ar saturado, já que é um fluido que deve percolar todo o meio de cultivo.

4.12 Avaliação da estabilidade dos pigmentos

Com o objetivo de verificar quão estáveis os pigmentos de *Monascus* podem ser em aplicações diversas, alguns ensaios foram realizados com a incubação de soluções aquosas e alcoólicas de pigmentos em diferentes condições de temperatura e pH. A estabilidade foi medida através da avaliação da absorbância dos extratos. A absorbância das soluções aquosas de pigmentos de *Monascus* diminui com o tempo, em qualquer das condições testadas. A diminuição na absorbância é mais significativa em temperaturas mais altas; a Figura 25 mostra esse efeito para 5 amostras de pigmentos em solução aquosa a pH 6 (um valor típico para alimentos) e diferentes temperaturas:

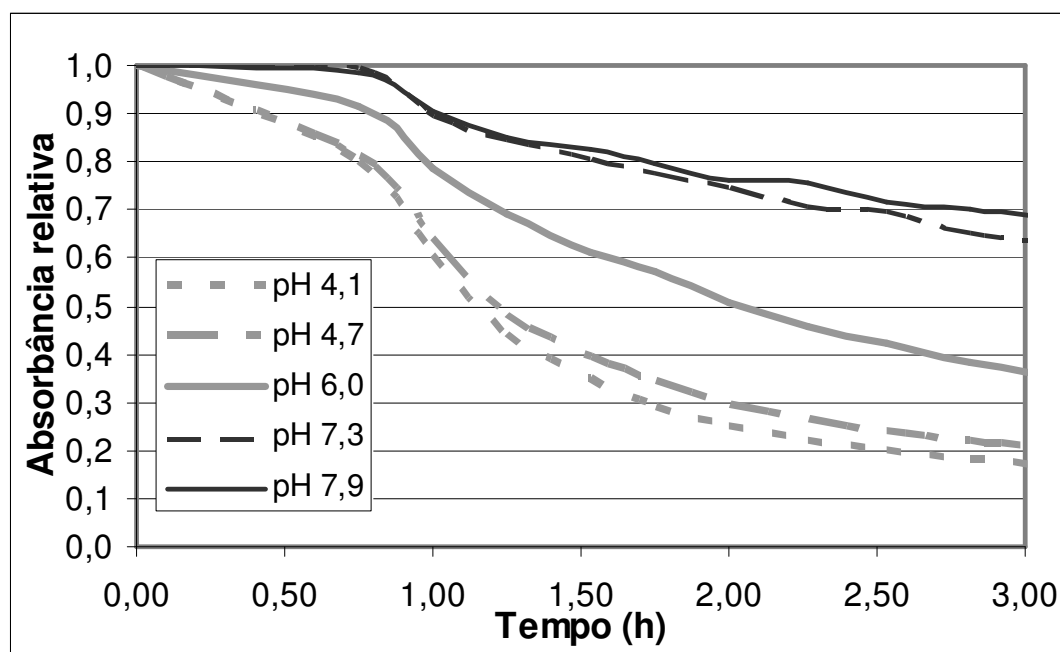
Figura 25 – variação da cor (medida como absorbância relativa) com o tempo (em h) para soluções aquosas de pigmento, a diferentes temperaturas de incubação com pH 6



O efeito da temperatura é similar ao efeito em outras degradações térmicas, embora um modelo de Arrhenius (de decaimento exponencial) não represente bem o sistema. Isso se deve, possivelmente, ao fato de que o extrato é uma *mistura* de pigmentos, cuja degradação pode se dar a diferentes velocidades e temperaturas. Fica claro, no entanto, que alterações de cor devem ser esperadas na formulação de produtos com *Monascus* que exijam processamento térmico – por exemplo, autoclavagem, secagem ou defumação.

O efeito do pH é igualmente claro: quando várias amostras de pigmento foram incubadas à mesma temperatura mas com diferentes valores de pH, na faixa de 4,1 a 7,9, observou-se que em pH mais baixos a diminuição da cor é mais significativa. Esse efeito é ilustrado na Figura 26:

Figura 26 – Variação da cor (medida como absorbância relativa) com o tempo (em h) para diferentes pH's, a 100 °C



A absorbância diminui mais rapidamente em valores de pH baixos. Esse efeito pode ser um problema para o uso de *Monascus* em alimentos ácidos, como iogurte. O efeito do pH pode ser devido à aceleração de interações com as moléculas de pigmentos, como por exemplo o rompimento de uma ligação éster nos pigmentos rubropunctamina ou monascorubramina; isso fica claro quando se observa que a estabilidade dos pigmentos é muito mais alta em etanol (dados não mostrados). O efeito do pH e da temperatura é sumarizado a seguir (Tabela 17):

Tabela 17 – Absorbância residual relativa de soluções de pigmentos, após 25h de incubação a diferentes temperaturas e pH's. O valor máximo é 1,00; os menores valores indicam a maior degradação.

pH	Temperatura, °C				
	0	32	40	60	100
4,1	0,799	0,863	0,794	0,493	0,132
4,7	0,870	0,885	0,820	0,460	0,149
6,0	0,831	0,865	0,805	0,572	0,155
7,3	0,827	0,843	0,863	0,724	0,266
7,9	0,837	0,916	0,883	0,789	0,531

Em uma tentativa de estabilizar os pigmentos, uma série de soluções a pH 7,0 com diferentes solutos como o antioxidante ácido ascórbico, sais oxidantes de Fe^{3+} e Cu^{2+} , e peptona (para providenciar grupos amino complexos, presentes em proteínas) foram testados; nenhum desses fatores contribuiu apreciavelmente para a estabilização dos pigmentos. Ensaio com as soluções etanólicas mostraram alta estabilidade do pigmento, o que indica bom potencial de uso em bebidas alcoólicas.

Em resumo, os resultados indicam que há uma diminuição importante na cor para todos os pH's em temperaturas superiores a 60°C, e que em pH mais altos (próximos à neutralidade) o pigmento é mais estável. Esses resultados estão em concordância com os encontrados por Fabre *et al.* (1993) e Lee e Chen (2000). Estudos futuros devem ser voltados para o mecanismo de degradação, provendo informação para a estabilização de pigmentos. A perda de cor por degradação na indústria de alimentos é comum, justamente por se utilizar pigmentos naturais com frequência. Por isso, pigmentos de *Monascus* continuam sendo um aditivo de cor promissor, mas é preciso considerar na formulação do produto que parte da cor pode degradar, dependendo das condições de processo e do tipo de alimento.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

No presente trabalho comparou-se uma linhagem isolada de *Monascus* sp com outras linhagens, avaliou-se substratos potenciais, métodos de extração de pigmento, formas de produção em arroz e estabilidade dos pigmentos produzidos. A partir dos resultados obtidos, pode-se chegar às seguintes conclusões:

5.1.1 *LPB 31 é uma linhagem adequada para a produção industrial de pigmentos.*

Os resultados obtidos mostram que a cepa isolada, LPB 31, é uma linhagem de *Monascus* sp com capacidade de crescimento equivalente ou superior às outras linhagens testadas, tanto em arroz como em bagaço de mandioca, em frascos. O teor de citrinina no fermentado produzido por essa linhagem é inferior ao obtido com as outras linhagens testadas, e mesmo inferior ao teor no produto comercial. A produção de pigmentos e a produtividade, foram superiores às das outras linhagens testadas, perdendo apenas para o produto comercial (produção 13% menor), donde pode-se concluir que a linhagem LPB 31 é adequada para a produção industrial de pigmentos de *Monascus*, sobre arroz.

5.1.2 *Etanol é o solvente orgânico mais adequado para a extração de pigmentos.*

Para extrair pigmentos de *Monascus*, sugere-se o uso de etanol até a concentração de 60% no meio extrativo, ou outro sistema de solventes de forma que o índice de polaridade médio do meio seja igual a 7. A forma de extração mais conveniente industrialmente é a agitação por 1h do fermentado com o solvente, à temperatura ambiente, na proporção de 3 partes de solvente para 1 parte de fermentado seco. Extrações exaustivas podem aumentar o rendimento da extração em 20%. No entanto, o uso de etanol mais concentrado favorece a posterior evaporação do solvente.

5.1.3 *Arroz é o substrato bruto mais adequado para a produção de pigmentos.*

Embora a produção de pigmentos de *Monascus* seja possível em substratos diversos, que com uma otimização podem vir a apresentar produção compatível com a obtida em arroz, quando se trata de substratos puros (outros cereais e tubérculos),

o arroz é o que fornece a maior produção de pigmentos. O bagaço de mandioca, substrato-alvo inicial do presente trabalho, apresenta em condições ótimas uma produção cerca de 10 vezes menor que a de arroz.

5.1.4 Bagaço de mandioca puro é um substrato potencial para produção de extratos.

Embora a produção em arroz seja 10 vezes superior à obtida em BM, este substrato é um resíduo agroindustrial, cujo custo pode justificar o seu uso para a produção de extratos (o uso de BM fermentado seco como aditivo não seria possível, devido ao baixo teor de cor). Outra vantagem do BM é a maior porosidade e menor aglutinação, que o tornam candidato à produção com escalas maiores de fermentação.

5.1.5 Condições para cultivo em meio sólido – arroz.

Para a produção de pigmentos de *Monascus* em FSS, as condições mais adequadas são aeração forçada (com ar saturado de umidade) de 1NmL/min.g de substrato úmido, para um leito de 8 cm de altura, durante 8 dias, com inóculo vegetativo, a 32°C. Obtém-se nessas condições uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,039\text{h}^{-1}$, e uma velocidade específica de produção de pigmentos de $27,5\text{ UA/g biomassa.h}^{-1}$. A produção também pode ser feita em bandejas, com produção de quase igual (embora reconheça-se a necessidade da otimização de condições no reator). Nesse caso recomenda-se uma altura de leito de 2 cm.

5.1.6 Estabilidade de pigmentos de Monascus.

Os pigmentos de *Monascus* são instáveis frente a extremos de pH e temperaturas altas, devendo ser usados em aplicações a temperaturas inferiores a 60°C e pH próximos da neutralidade. O pigmento é especialmente adequado para aplicação em alimentos refrigerados, caso em que a degradação de cor é baixa, ou em bebidas alcoólicas – caso em que a degradação de cor não pode ser observada em um intervalo de vários meses.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Seguem algumas sugestões para futuros trabalhos relacionados a este tema, no LPB.

5.2.1 *Geração e seleção de linhagens mutantes de Monascus*

A maior parte dos pigmentos produzidos por *Monascus sp* é intracelular, comum a fração pequena de pigmentos hidrossolúveis. Como a verificação qualitativa da produção de pigmentos em placas de Petri é simples, por inspeção, é possível tentar gerar mutantes (usando luz ultravioleta) que produzam mais pigmentos hidrossolúveis. Essa é uma forma simples de aumentar o potencial industrial de linhagens já conhecidas.

5.2.2 *Formulações com substratos mistos*

Como a maior produção de pigmentos se dá com o arroz, que é um substrato de fácil aglutinação e compactação para escalas de processo, ensaios futuros de produção de pigmentos deveriam incluir um estudo de formulações de arroz + BM, procurando um compromisso entre a produção de pigmentos e a compactação do meio.

5.2.3 *Desenvolvimento de um condicionador de ar para reatores de FSS*

Um dos problemas encontrados na fermentação em reator é o controle de temperatura do meio de fermentação. Um condicionador do ar de entrada, controlado usando como referência a temperatura média no leito do reator certamente melhorará a qualidade das fermentações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOK & CO 2003 – web site visited at www.allok.com at 10/10/2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Acessado via www.anvisa.gov.br em nov/2004.

AQUARONE E., LIMA U. A., BORZANI W., SCHMIDELL W. Biotecnologia Industrial – vol 4 – 2ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2002

ARLT U., The legislation of food colors in Europe 1998 Natcol:Basle Acessado via www.natcol.com em nov/2004.

ATCC (American Type Culture Collection) Catalogue of Fungi/Yeasts 17th ed. Maryland: ATCC, 1987

ATCC (American Type Culture Collection) Catálogo online: endereço eletrônico www.atcc.org acessado em 09/03/04. Maryland: ATCC, 2004

BETINA V. (editor) Micotoxins – production, isolation, separation and purification 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1984

BLANC P. J., LORET M. O., GOMA G. Production of citrinin by various species of *Monascus* Biotech. Lett. 17 (3), 1995: 291-294

BLANC P. J., LAUSSAC J.P., GOMA G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin Int. J. Food Microbiol 27, 1995a: 201-213

BODNER G. M., PARDUE H. L. Chemistry – An Experimental Science 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1995

BRODER C. V., KOEHLER P.E. J. Food Sci. 45: 567-569, 1980.

CARVALHO J. C. Produção de diacetil e acetoína: desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Dissertação de Mestrado – Engenharia Química – UFSC, 1999.

CARVALHO J. C., SOCCOL C. R., MIYAOKA M. F. Produção de pigmentos de *Monascus* em meios à base de bagaço de mandioca. Em: Anais do VII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Regional Paraná-SBCTA-PR (2001) ABM2-15.

CARVALHO J. C., BAGGIO C., KARP S.G., MIYAOKA M.F., SOCCOL C.R. Comparision of different solvents and extraction methods for pigments produced by *Monascus* sp. in solid state fermentation. Em: Anais do VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas – SHEB (2002)

CARVALHO J C, PANDEY, A., BABITHA, S., SOCCOL, C. R. 2003. Production of *Monascus* Biopigments: an overview. Agro Food Industry Hi-Tech. MILANO: , v.14, n.6, p.37 - 42.

CHEN M. H., JOHNS M. R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus* App. Microbiol. Biotechnol. (1993) **40**:132-138

CHEN M. H., JOHNS M. R. Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus* Enzyme Microb. Technol., (1994) 16: 584-590

CHIU S. W., POON Y. K. Submerged production of *Monascus* pigments Mycologia 85 (2), 1993: 214-218

DOWNHAM A., COLLINS P. Colouring our foods in the last and next millennium Intl. J. Food Sci. Technol. 35 (2000), 5-22

FABRE C. E., GOMA G., BLANC P. J. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber* J. Food Sci., 58 (5), 1993: 1099-1110

FDA – U.S. Food and Drug Administration Food Color Facts: endereço eletrônico <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/colorfac.html> (1998) sobre documento de 1993. Acessado em 25/07/2002

FRANCO, G. Tabela de Composição Química dos Alimentos 9ª ed. Rio de Janeiro: Liv. Ed. Atheneu, 1992

GERMANO S. Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium sp.* por fermentação no estado sólido Curitiba, 2000. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná

GONG P., GUAN X., WITTER E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption Applied Soil Ecology 17 (2001) 285–289

GORDON, D.B. in WILSON K., WALKER J., P. Practical Biochemistry 4th ed. London: Cambridge University Press, 1995

GUTAROWSKA B., ZAKOWSKA Z. Elaboration and application of mathematical model for estimation of mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination International Biodeterioration & Biodegradation 49 (2002) 299 – 305

HAJJAJ H., KLAEBÉ A., LORET M. O., TZÉDAKIS T., GOMA G., BLANC P. Production and Identification of N-Glucosylrubropunctamine and N-Glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and Occurrence of Electron Donor-Acceptor Complexes in These Red Pigments Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997), 2671-2678

HAJJAJ H., BLANC P., GROUSSAC E., URIBELARREA J. L., GOMA G., LOUBIERE P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation Enz. Micr. Technol. 27 (2000) 619-625

HAMDI M., BLANC P. J., GOMA G. Effect of aeration conditions on the production of red pigments by *Monascus purpureus* growth on prickly pear juice Process Biochem 31 (6), 1996: 543-547

HAMDI M., BLANC P. J., GOMA G. A new process for red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* Bioprocess Eng. 17, 1997: 75-79

HAN O., MUDGET R. E. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations Biotechnol. Prog. 8 (1992) 5-10

JACOBSON G., WASILESKI J. in Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients 1st ed New York: John Wiley & Sons, 1994

JOHNS M. R., STUART D. M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture J. Ind. Microbiol. 8 (1991), 23-38

JUNG H., KIM C., KIM K., SHIN C. S. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1302-1306

JŮZLOVÁ P., MARTÍNKOVÁ L., LOZINSKI J., MACHEK F. Ethanol as substrate for pigment production by the fungus *Monascus purpureus* Enzyme Microb. Technol., 16, 11(1994): 996-1001

JŮZLOVÁ P., MARTÍNKOVÁ L., KŘEN V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review J.Ind. Microbiol., 16, 1996: 163-170

KIM J. S., CHOI K. H., CHOI J. Y., LEE Y. S., KWON I. B. Method for hyper-production of *Monascus* pigments US PAT. 5,429,943 (1995)

KIM H. J., KIM J. H., OH H. J., SHIN C. S. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation Proc. Biochem. 38 (2002) 649-655

KLAMER M., BÅÅTH E. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6,9 Soil Biology & Biochemistry 36 (2004) 57–65

KUJUMDZIEVA A. V., HALLET J. N., SAVOV V. A., RASHEVA T. V. *Monascus purpureus* strain producer of pigments and by-products U.S. PAT. 5,627,068 (1997)

LEE Y. K., CHEN D. C., TOSHIOMI Y. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method J. Ferm. Bioeng. 79 (5), 1995: 516-518

LEE Y. K., CHEN D. C. Applications of *Monascus* pigments as food colorant (2000) in www.allok.com/literature accessed oct 2000

LIN T. F., DEMAINE A. L. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**, 1991: 70-75

LIN T. F. Studies on the formation of *Monascus* red pigments PhD Thesis MIT, Massachusetts, 1991a

LIN T. F., DEMAINE A. L. Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes J. Indl. Microbiol. **9**, 1992: 173-179

LIN T. F., DEMAINE A. L. Leucine interference in the production of water-soluble red *Monascus* pigments Arch. Microbiol. 162, 1994: 114-119

LINDBLOM C.M, WACHENFELDT E, TRANVIK L.J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death Journal of Microbiological Methods 59 (2004) 253– 262

MA J., LI Y., YE Q., LI J., HUA Y., JU D., ZHANG D. Constituents of red yeast rice, a traditional chinese food and medicine J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5220-5225

MARGALITH P. Z., Pigment Microbiology 1st ed. London: Chapman & Hall, 1992.

MARTÍNKOVÁ L., JŮZLOVÁ P., VESELÝ D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus* J Appl Bacteriol 79, 1995: 609-616

The MERCK Index 12th ed. 1996 New Jersey: Merck &Co., Inc.

MATILLA P., LAMPI A.M., RONKAINEN R, TOIVO J., PIIRONEN V. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms Food Chemistry 76 (2002) 293–298

MIYAKE T., OHNO S., SAKAI S. Process for the production of *Monascus*-pigment US Patent 4,442,209 1984

MIYASHIRA G. Y., RODRIGUES R., KILIKIAN B. V. Seleção de linhagens de *Monascus* sp. para cultivo em meio semi-sólido Florianópolis: anais do congresso SINAFERM, 2003.

MONTGOMERY H.J., MONREAL C.M., YOUNG J.C., SEIFERTD K.A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses Soil Biology & Biochemistry 32 (2000) 1207±1217

NAZARÉ R. F. R., Potencialidade de plantas amazônicas produtoras de corantes naturais <http://www.uesb.br/sbcn/amazonia.html>, acessado em 06/08/2001

OGIHARA J., KATO J., OISHI K., FUJIMOTO Y. Biosynthesis of PP-V, a Monascorubramine Homologue, by *Penicillium* sp. AZ J. Biosci. Bioeng. 6 (2000) 678-680

PALO M. A., VIDAL-ABEVA L., MACEDA L. M. A study on angkak and its production Phill. J. Sci. 89 (1), 1960

PANDEY A, Recent developments in solid-state fermentation, Proc. Biochem., 27 (1992) 109-117

PANDEY A., SOCCOL C. R., MITCHELL D. A., New developments in solid-state fermentation, Part-1. Bioprocesses and products, Proc. Biochem., 25 (2000) 1153-1169

PANDEY A., SOCCOL C. R., RODRIGUEZ-LEON J. A., NIGAM P. Solid State Fermentation in Biotechnology – Fundamentals & Applications 1st ed. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2001.

PASTRANA L., BLANC P. J., SANTERRE A. L., LORET M. O., GOMA G. Production of red pigments by *Monascus ruber* in sythetic media with a strictly controlled nitrogen source Process Biochem. 30 (4), 1995: 333-341

PITT J. I., HOCKING A. D. Fungi and food spoilage 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1997

RASHEVA T., HALLET J. N., KUJUMDZIEVA A. Taxonomic investigation of *Monascus purpureus* 94-25 strain J. Cult. Collec., 2, 1997: 51-59

RODRIGUEZ-LEÓN, J. A. comunicação pessoal, 2004

ROSENBLITT A., AGOSIN E., DELGADO J., CORREA R. P. Solid substrate fermentation of *Monascus purpureus*: growth, carbon balance, and consistency analysis Biotechnol. Prog. 16 (2000)152-162

SANTERRE A. L. QUELLNEC I., DESTRUHAUT C., POURCIEL J. B., BLANC P. J. On-line evaluation of fermentation broth colour, Biotech. Techniques, vol.8, no.5, pp.319-324, 1994.

SANTERRE A. L., QUELLNEC I., BLANC P. J. A fedbatch strategy for optimal red pigment production by *Monascus rubber* Bioproc. Eng. 13, 1995: 245-250

SATO K., IWAKAMI S, GODA Y., Novel natural colorants from *Monascus anka* U-1 Heterocycles 34 (11), 1992

SEITZ, L.M., SAUER, D.B., BURROUGHS, R., MOHR, H.E., HUBBARD, I.D., 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69, 1202–1203.

SHEPERD D., CARELS M. S. C. Red pigment production US Patent 4,145,254 1979

SHIN C. S., KIM H. J., KIM M. J., JU J. Y. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* *Biotechnol. Bioeng.* 59 (5), 1998: 576-581

SOCOL C.R., VANDENBERGHE L. P. S., Overview of Applied Solid-State Fermentation in Brazil. *Biochemical Eng. J.*, 13 (2003) 205-218.

St. MARTIN E. J. Production of crystalline pigments from *Monascus* during fermentation US PAT. 4,927,760 (1990)

St. MARTIN E. J., KUREK P. R., SCHUMACHER E.F. Water-soluble red pigments from monascorubrin and rubropunctatin as food colorants US PAT. 5,013,565 (1991)

ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry 2nd ed Weinheim: VCH, 1985-1995 36v. pág 245 vol A20

VARGAS F. D., JIMÉNEZ A. R., LÓPEZ O. P. Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3): 173-289 (2000)

WATANABE T., YAMAMOTO A., NAGAI S., TERABE S. Separation and determination of *Monascus* yellow pigments for food by micellar electrokinetic chromatography *Analyt. Sci.*, 13, 1997: 571-575

WILD D., GÁBOR T., HUMPHREY H. U. New *Monascus* metabolites with a pyridine structure in red fermented rice *J Agric Food Chem* 51 (2003) 5493-5496

WONG, H. C., KOEHLER, P. Production and isolation of an antibiotic from

Monascus purpureus and its relationship to pigment production J Food Sci 46, 1981: 589-592

YAMAGUCHI Y., ITO H., WATANABE S., YOSHIDA T., KOMATSU A. Water soluble *Monascus* pigment US Patent 3,765,906 1973

YONGSMITH B., TABLOKA W., YONGMANITCHAI W., BAVAVODA R. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium World J. Microbiol. Biotechnol. 9, 1993: 85-90

ZHANG M. L., PENG C. X., ZHOU Y. F. US PAT. 6,046,022 (2000)

ZHAO X.R., LIN Q., BROOKES P.C. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? Soil Biology & Biochemistry (in press) 2004